



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année : 2014

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Environnement et contenu bactériologique du canal endocervical pendant la grossesse.**

**Elaboration d'un protocole de prélèvement endocervical protégé.**

Présentée et soutenue publiquement le **28 avril 2014 à 18h**  
au **Pôle Recherche**

**Par Justine BAUWENS**

---

**JURY**

**Présidente :**

Madame le Professeur Véronique Houfflin-Debarge

**Assesseurs :**

Monsieur le Professeur Damien Subtil

Madame le Professeur Karine Faure

Monsieur le Docteur Rodrigue Dessein

**Directeur de Thèse :**

Monsieur le Professeur Damien Subtil

## Liste des abréviations

IVG	interruption volontaire de grossesse
PEP	Prélèvement endocervical protégé
PV	Prélèvement vaginal
SA	Semaines d'aménorrhée
cm	centimètre
CPP	comité consultatif de protection
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (cycle seuil)
EI	Effet indésirable
EP	récepteur aux prostaglandines E <sub>2</sub>
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IST	infection sexuellement transmissible
ml	millilitre
mm	millimètre
ng	nanogramme
NP	non précisé
Ø	diamètre
PCR	polymerase chain reaction
VS	versus

Table des matières :

Introduction .....	7
Position du problème .....	7
Objectifs.....	10
1 <sup>ère</sup> partie : Environnement et contenu bactériologique du canal endocervical pendant la grossesse.....	11
Le col utérin .....	11
1. Embryologie : .....	11
2. Anatomie :.....	11
3. Histologie :.....	12
4. Propriétés/ fonctions : .....	13
5. Echographie : .....	17
Le canal endocervical .....	19
1. Embryologie : .....	19
2. Anatomie :.....	19
3. Histologie :.....	20
4. Fonctions/ propriétés : .....	26
Le bouchon muqueux.....	27
1. Origine : .....	27
2. Composition/propriétés physico-chimiques : .....	28
3. Fonctions :.....	31
4. Bio-marqueurs endocervicaux et prématurité :.....	34
Microbiologie/bactériologie du canal endocervical.....	37
1. Problèmes associés au prélèvement endocervical chez la femme enceinte :.....	37
2. Microorganismes saprophytes du canal endocervical .....	40
3. Microorganismes et pathologie infectieuse : .....	42
2 <sup>ème</sup> partie : Contribution à la recherche du meilleur matériel de prélèvement endocervical protégé .....	45
Objectifs :.....	45
Matériel et méthode : .....	46
1. Population : .....	46
4. Matériel utilisé : .....	46
5. Déroulement d'un prélèvement endocervical : .....	47
6. Analyses bactériologiques : .....	47
7. Résultats :.....	48
Discussion.....	56
Création d'un cathéter protégé de prélèvement avec le laboratoire CCD .....	57

Bibliographie .....	61
Annexes : Proposition d'un protocole de prélèvement d'endocol protégé chez la femme enceinte au premier trimestre .....	67
ANNEXE 1 : Plan d'étude.....	67
1. Rationnel de l'étude :.....	67
2. Objectifs de l'étude .....	68
3. Conception de la recherche.....	69
4. Logistique de l'étude .....	72
5. Biologie.....	74
6. Evénements indésirables .....	76
7. Financement.....	76
ANNEXE 2 : Lettre d'information patiente .....	77
ANNEXE 3 : Lettre d'information pour la participation à une recherche biomédicale .....	79
ANNEXE 4 : Formulaire de consentement pour la participation à une recherche biomédicale.....	81
ANNEXE 5 : Feuille de recueil patiente.....	82

## Introduction

### **Position du problème**

La prématurité concerne 5 à 9 % des naissances. Elle est responsable des trois quarts de la mortalité périnatale et de la moitié de la mortalité à long terme <sup>[1]</sup>.

Les accouchements prématurés et les avortements du 2<sup>e</sup> trimestre sont d'origine infectieuse dans 25 à 40% des cas <sup>[1,2]</sup>, marquée par la présence de bactéries au contact des membranes fœtales <sup>[3]</sup>.

L'évolution des méthodes de détection, avec l'avènement de la biologie moléculaire, a permis d'attribuer à une plus grande part des accouchements prématurés cette origine.

Parmi les quatre mécanismes avancés par Romero et al. <sup>[4]</sup>, la voie ascendante est la plus fréquemment incriminée <sup>[4,5]</sup>. Du stade 1 (anomalies de la prolifération microbienne vaginale) au stade 4 (infection fœtale) traditionnellement décrits, plusieurs études vont dans le sens d'une colonisation de l'espace extra-amniotique vers l'espace intra-amniotique <sup>[6]</sup>.

Les liens statistiques entre infection ovulaire ascendante et accouchement prématuré sont forts mais non suffisants pour établir une causalité directe <sup>[1,4-6]</sup>.

Le mécanisme principal dans le déclenchement d'un travail prématuré est basé sur la physiopathologie de la réaction inflammatoire <sup>[1]</sup>. La réaction immunitaire engendre la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de prostaglandines responsables de contractions utérines et des modifications cervicales. Par ailleurs, l'augmentation locale des enzymes de dégradation (métalloprotéases) aboutit à une rupture prématurée des membranes.

Plusieurs inconnues persistent dans la compréhension du mécanisme physiopathologique exact : le travail prématuré est-il la conséquence d'une réaction inflammatoire locale aspécifique ? Une vaginose bactérienne ou une cervicite pourraient en être la cause. Ou bien s'agit-il d'un véritable mécanisme infectieux qui peut être ou non d'origine gynécologique <sup>[5]</sup> ? Les infections systémiques sont en effet source de contractions. Enfin, certains arguments sont en faveur d'une forte réaction inflammatoire compliquant l'infection fœtale <sup>[6,7]</sup>.

La flore vaginale a été largement étudiée alors que la composition des sécrétions cervicales et de la flore endocervicale doit être approfondie.

La relation entre la vaginose bactérienne en début de grossesse et la prématurité était jusqu'à maintenant admise <sup>[8]</sup> sans pour autant qu'un lien de causalité ait été montré <sup>[9]</sup>.

Les résultats de l'étude PREMEVA montrent que le vagin est probablement encore trop « loin » de l'œuf (Données non publiées). Ceci est confirmé par la méta-analyse de Brocklehurst et al. Cette revue fournit peu de preuve en faveur de la recherche et du traitement de la vaginose bactérienne chez la femme enceinte pour prévenir la prématurité <sup>[10]</sup>.

Le rôle éventuel des différents acteurs du canal endocervical (glandes, bouchon muqueux, bactéries, fluides) pour défendre l'œuf ou au contraire le laisser s'infecter par des bactéries est encore largement incompris. La recherche d'un risque d'accouchement prématuré augmenté pourrait passer par l'exploration d'une présence anormale de microorganismes dans le canal cervical.

La littérature sur ce sujet est peu fournie et ancienne. Les études sont difficiles à interpréter car la description du mode de prélèvement endocervical est peu précise : il n'existe pas de procédure standardisée de prélèvement qui permet d'éliminer une contamination par la flore

vaginale <sup>[10]</sup>. La fiabilité de ces études peut être remise en question. De plus, l'existence de milieux de culture limités ne permettait pas de détecter la présence de certains micro-organismes.

Dans l'étude récente de Hansen et al <sup>[11]</sup>, des prélèvements d'endocol à visée bactériologique sont réalisés à une profondeur définie chez la femme enceinte non symptomatique. Il s'agit d'une étude prospective chez 21 femmes au premier et troisième trimestre. Un prélèvement vaginal, ainsi qu'un prélèvement endocervical distal et proximal sont réalisés selon un protocole précis. La charge bactérienne (ARN16S) est plus importante de manière significative dans le vagin que dans l'endocol. De la même manière, la charge bactérienne est plus forte dans la partie distale du bouchon muqueux que dans sa partie proximale.

## **Objectifs**

L'objet de ce travail est d'approfondir les connaissances sur l'environnement endocervical, d'en décrire l'anatomie, l'histologie, l'immunologie, la bactériologie et d'en connaître les modifications physiologiques pendant la grossesse. Il s'agit également de préciser le lien entre ce microenvironnement et la survenue d'un accouchement prématuré. La finalité de cette étude est d'aboutir à la rédaction d'un protocole de recherche exploratoire destiné à établir avec précision l'écologie bactérienne du canal endocervical.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché quel matériel était le plus adapté pour réaliser des prélèvements endocervicaux chez la femme enceinte dans une étude informelle exploratoire chez des patientes ayant recours à une IVG, en décrivant notre « standard » de technique de prélèvement. Nous avons créé un nouveau dispositif médical permettant de réaliser des prélèvements endocervicaux protégés selon les critères que nous avons définis chez la femme enceinte.

L'ensemble de ces données nous permet de proposer les modalités d'un protocole de prélèvements endocervicaux protégés à 2,5 cm au premier trimestre de la grossesse chez des patientes ayant recours à une IVG.

## **1<sup>ère</sup> partie : Environnement et contenu bactériologique du canal endocervical pendant la grossesse.**

### **Le col utérin**

#### ***1. Embryologie :***

Dans l'embryogénèse, le col de l'utérus a une origine mésodermique <sup>[12]</sup>. A partir de la 9<sup>ème</sup> semaine de développement, le paramésonephros ou canaux de Müller, en l'absence de stimulation par l'AMH (Anti-Müllerian Hormone), va se différencier en trompes, utérus, col, et tiers supérieur du vagin <sup>[13]</sup>. L'intégralité de ces organes ont la même origine : épithélium et mésenchyme sous-jacent <sup>[12]</sup>.

#### ***2. Anatomie :***

Le col utérin a une morphologie unique, « dynamique ». Chez la femme non enceinte, il mesure 3 cm de long <sup>[14,15]</sup>, 2 à 2,5 cm de diamètre antéro-post et 2,5 à 3 cm de large. Il est cylindrique, avec une portion supra vaginale et une portion vaginale. La portion supra-vaginale fait suite à l'isthme utérin, elle est entourée par le paramètre dans le lequel se trouve le croisement entre l'uretère et l'artère utérine <sup>[14]</sup>. Un cul de sac annulaire sépare ces deux portions. La partie distale fait saillie dans le vagin. On trouve à son sommet l'orifice externe du col, porte d'entrée du canal endocervical. Le col est vascularisé, de façon bilatérale, par une artère cervico-vaginale, en général unique et volumineuse, branche terminale de l'artère utérine. Elle est accompagnée en général par six artères cervicales. Le réseau lymphatique, sous forme de nombreux plexus, est en étroite communication avec le drainage vésical et rectal. L'innervation est issue du plexus hypogastrique inférieur <sup>[14]</sup>

### *3. Histologie :*

La partie vaginale du col ou exocol, soumise à un environnement hostile est recouverte par un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé aglandulaire. L'endocol est tapissé d'un épithélium cylindrique glandulaire. La zone de jonction entre les deux épithéliums se fait au niveau de l'orifice externe <sup>[16]</sup>. Il s'agit d'un secteur épithélial en renouvellement permanent, et particulièrement exposée aux agents pathogènes provenant du milieu extérieur, <sup>[17]</sup>.

Le tissu conjonctif sous-jacent est riche en fibroblastes et en collagène. Celui-ci est responsable de la rigidité du col <sup>[18]</sup>. Il existe un continuum de fibres musculaires lisses avec l'utérus, qui ne représentent que 10 à 15 % du tissu cervical <sup>[19,20]</sup>. Cette proportion est faible notamment dans la partie vaginale du col <sup>[21]</sup>, et ne participe donc pas à sa solidité du col <sup>[19]</sup>. La matrice extra-cellulaire est formée de collagène de type 1 et 3, de glycoaminoglycanes dont un des principaux est l'acide hyaluronique, de protéoglycanes (association d'un glycoaminoglycane à une protéine), d'élastine et d'eau <sup>[22]</sup>.

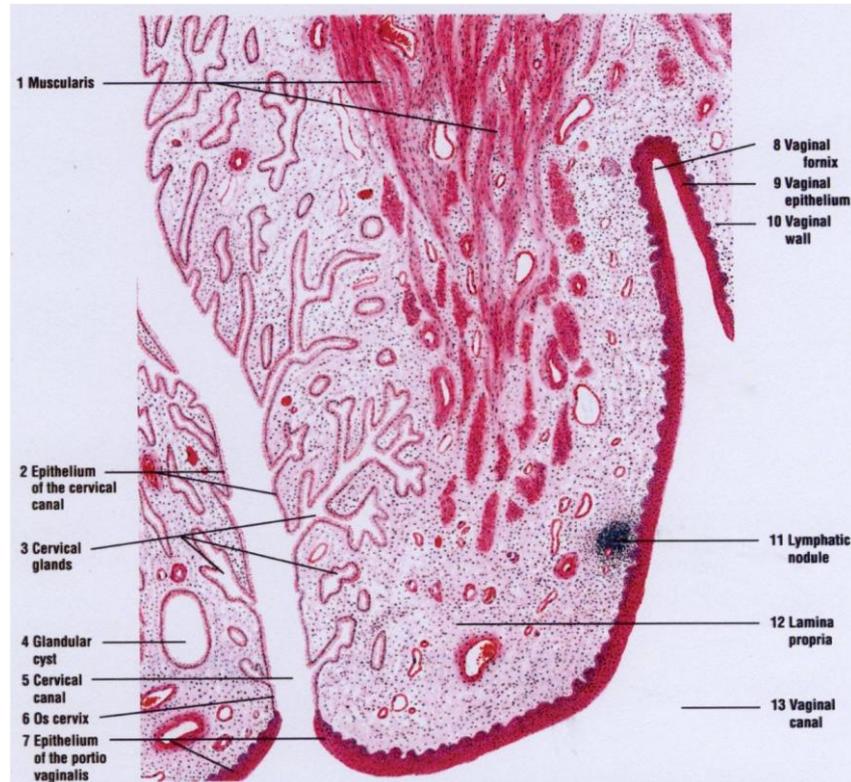


Figure 1: Col, canal endocervical, et cul-de-sac vaginal en coupe longitudinale. Coloration éosine et hématoxyline. Faible grossissement. D'après Health, Wheater's Fonctionnal Hystology<sup>[16]</sup>

#### 4. Propriétés/ fonctions :

Le col doit faire un compromis entre solidité et élasticité. Il s'agit, dans l'intervalle très court de la grossesse, des fonctions antagonistes : il doit former, en début de grossesse, une barrière protectrice solide. Il doit ensuite se ramollir, s'ouvrir, se dilater et s'effacer lors de l'accouchement. Ses caractéristiques biomécaniques varient énormément pendant cette période, et surtout pendant le travail. Le stroma cervical subit d'importantes modifications tissulaires et moléculaires<sup>[22]</sup>. On sait que la maturation cervicale précède de plusieurs semaines le travail et que les contractions utérines aboutissant à l'accouchement ne sont que les derniers évènements d'un long processus<sup>[23]</sup>.

### Collagène

Le collagène dit « stable » a une structure en triple hélice. Il peut ensuite être réticulé par une enzyme, la peptidyl-lysine oxydase en fibrilles. Fibres et faisceaux créent ainsi la résistance du tissu dans le col non gravide. Le tabac inhibe cette enzyme <sup>[24]</sup>. Pendant la grossesse, la concentration en collagène reste la même (74%) mais sa solubilité augmente passant de 37 à 80 %. La diminution de la réticulation du collagène, grâce à l'activité lytique amplifiée de la collagénase, augmente les capacités élastiques du tissu <sup>[19][22]</sup>. Les patientes qui ont un travail long ont de plus fortes concentrations en collagène dans le col <sup>[25]</sup>. La désorganisation structurale du collagène entraîne cliniquement un ramollissement du col.

### Hydratation

La matrice extracellulaire est riche en glycoaminoglycanes dont le principal, l'acide hyaluronique, a une forte affinité pour les molécules d'eau. Il favorise l'hydratation du tissu cervical qui augmente d'environ 5 % pendant la grossesse, passant de 75% à 80%, favorisant ainsi le ramollissement du col. De même, la concentration en glycoaminoglycanes double pendant cette période <sup>[22]</sup>. Les recherches récentes font part d'une molécule d'acide hyaluronique de bas poids moléculaire capable d'induire une néovascularisation, une production de cytokines, et de métalloprotéinases qui sont des acteurs importants de la maturation cervicale <sup>[26]</sup>. Par ailleurs, l'injection intra-cervicale de hyaluronidase (enzyme de dépolymérisation de l'acide hyaluronique) accélère la dilatation cervicale pendant le travail <sup>[26,27]</sup>.

### Composante élastique

Les fibres d'élastine ont une organisation parallèle à celle du collagène. Dans leur configuration « fermée », elles jouent un rôle primordial dans le maintien du col fermé. Chez les patientes ayant une incompétence cervicale, les biopsies montrent une diminution de la quantité et un défaut de structure de cette molécule <sup>[28]</sup>. Sous la contrainte mécanique des

contractions utérines, ces fibres peuvent se distendre jusqu'à deux fois et demi, favorisant la dilatation cervicale [24].

### Modifications cellulaires

Des études récentes indiquent que la cascade biochimique conduisant à la maturation cervicale peut être activée par déformation mécanique de fibroblaste du col [29].

Pendant la maturation cervicale, les cellules inflammatoires, notamment les monocytes et les neutrophiles s'accumulent dans le stroma cervical [30]. Les neutrophiles sont une source de collagénase, les prostaglandines et l'interleukine 8 participent à leur recrutement dans le tissu cervical [18].

### Modifications de structure pendant la grossesse

Read et al. décrivent les modifications cervicales tissulaires et moléculaires suivantes lors de la gestation chez la souris :

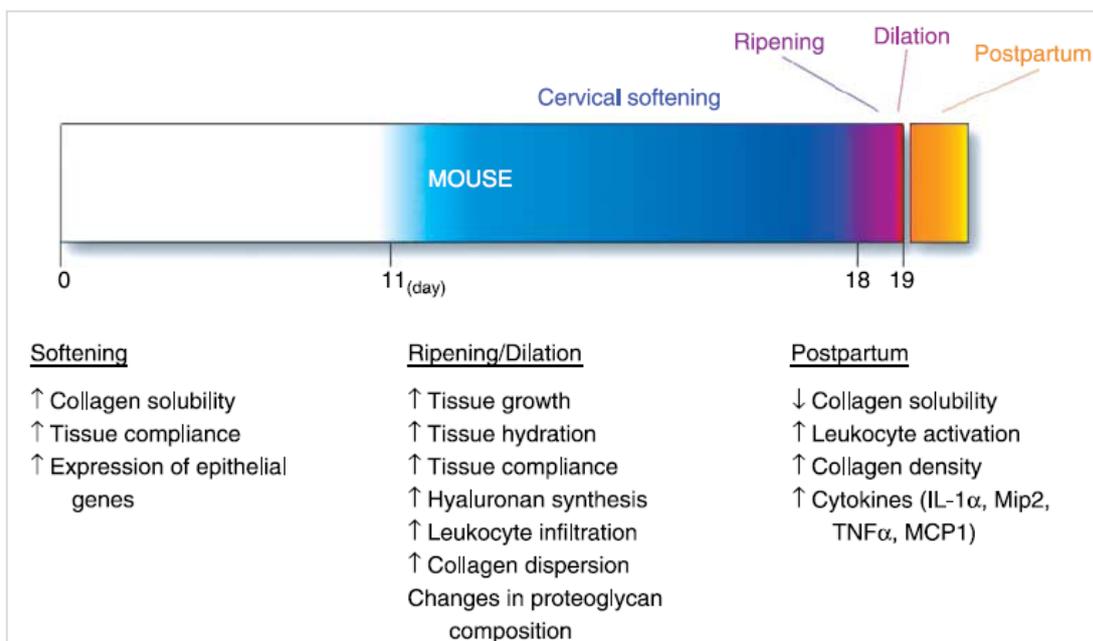
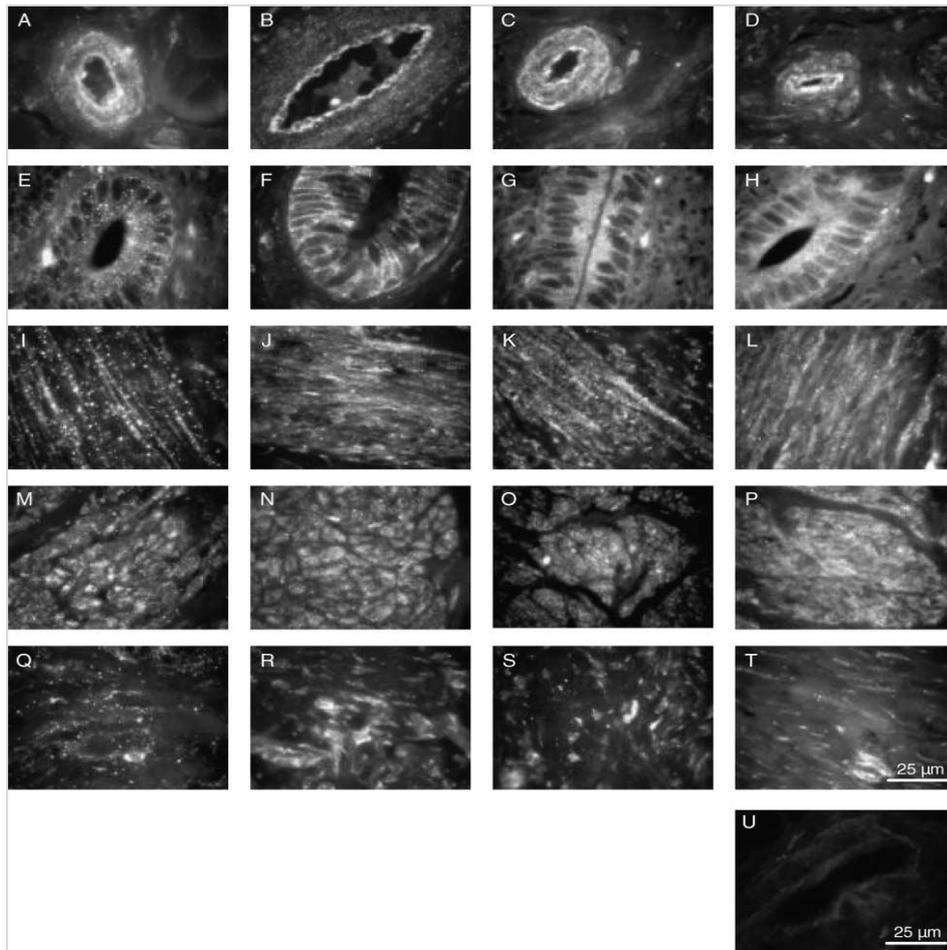


Figure 2 : Schéma représentatif des différentes phases de la gestation de la souris. La physiologie cervicale peut être divisée en phases distinctes: ramollissement, raccourcissement et dilatation, réparation du post-partum. Les phases de raccourcissement et de dilatation sont décrites ensemble dans la mesure où ce phénomène n'est pas suffisamment connu pour être divisé en deux parties séparées. La période de réparation du post-partum correspond aux 24 heures suivant l'accouchement. D'après Read et al. [31]

*Sensibilité aux prostaglandines et régulation par les hormones stéroïdes*

Les effets des prostaglandines sur le col sont moins connus alors que leur importance a été beaucoup étudiée au sein du myomètre. On sait que les quatre sous-types de récepteurs (appelés EP) aux prostaglandines  $E_2$  s'expriment à la surface de la majeure partie des cellules qui composent le col : les vaisseaux sanguins, l'épithélium du canal endocervical, le muscle lisse, le stroma. Les récepteurs EP1 et EP3 sont responsables de la contraction du muscle lisse alors que EP2 et EP4 jouent un rôle dans sa relaxation. EP2 et EP4 interviennent également dans la vasodilatation. Les prostaglandines augmentent par ailleurs la synthèse de glycoaminoglycane par les fibroblastes cervicaux via le récepteur EP4. L'expression de ces récepteurs n'est pas modifiée par la progestérone. En revanche, la présence d'œstrogènes diminue l'expression d'EP1 et EP3. Ce déséquilibre entre ces deux catégories de récepteurs aux fonctions antagonistes favoriserait ainsi la vasodilatation, l'œdème, l'infiltration leucocytaire, et le relâchement musculaire, éléments primordiaux pour la maturation et la dilatation cervicale <sup>[32]</sup>.



*Figure 3 : Immunolocalisation des récepteurs aux prostaglandines (EP) dans les tissus du col de brebis « contrôle ». La localisation des récepteurs EP1 (A, E, I, M, Q), EP2 (B, F, J, N, R), EP3 (C, G, K, K, O, S) et EP4 (D, H, L, P, T) a été analysée par immunofluorescence indirecte. On retrouve des récepteurs dans les vaisseaux sanguins (A, B, C, D), dans l'épithélium du canal endocervical (E, F, G, H), dans la couche musculaire circulaire (I, J, K, L), dans la couche musculaire longitudinale (M, N, O, P) et dans le stroma (Q, R, S, T). Les témoins négatifs ont été réalisées en remplaçant le premier anticorps par du sérum de lapin non immunisé (U). D'après Schmitz et al.<sup>[32]</sup>*

### **5. Echographie :**

Le col utérin, mesuré en échographie entre 11 et 13<sup>+6</sup> SA mesure environ 33 mm. Cette longueur est reproductible dans les différentes études sur ce sujet. Cependant, certains auteurs retrouvent une longueur avoisinant les 40-45 mm. Crane et al. expliquent ceci par l'intégration du segment inférieur, encore peu développé, dans ces mesures <sup>[33]</sup>.

Lorsque que l'on mesure la longueur du col entre 20 et 24 SA chez des patientes asymptomatiques à haut risque d'accouchement prématuré, la valeurs de 25 mm est communément admise comme facteur prédictif d'un accouchement avant 35 SA [33].

Récemment, certaines publications ont mis en lumière un autre marqueur morphologique en échographie appelé « cervical gland area » (figure 4) : il s'agit de la région entourant le canal endocervical et qui correspondrait à la région des « glandes » ou « cryptes ». Cette région peut être soit hyperéchogène soit hypoéchogène par rapport au stroma cervical. Pires et al. montrent dans une étude prospective que l'absence de « cervical gland area » chez une patiente asymptomatique entre 21 et 24 SA est un facteur de risque d'accouchement prématuré. La non-détection de cette zone pourrait correspondre à une maturation cervicale débutante [34].

De même, Grgic et al. montrent que cette zone est au moins aussi prédictive de l'accouchement prématuré que la longueur cervicale [34].

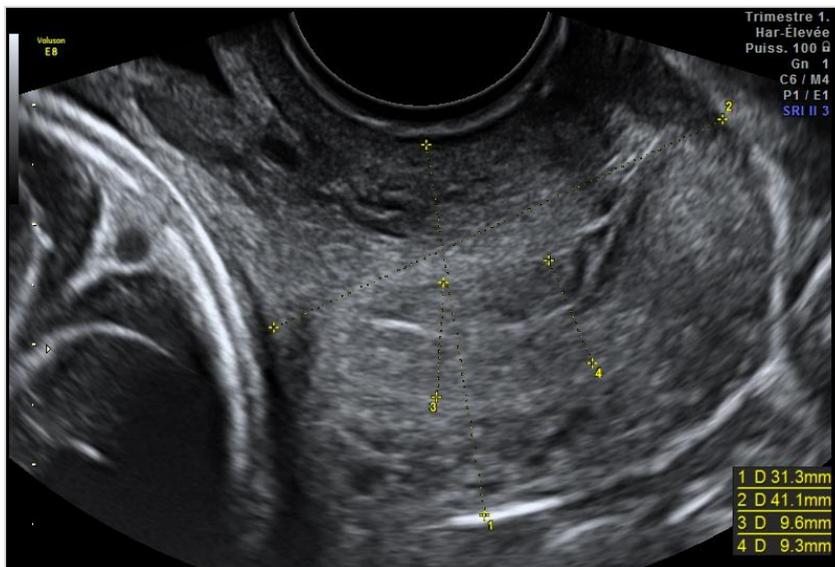


Figure 4 : Coupe longitudinale d'un col utérin au premier trimestre de la grossesse en échographie par voie endovaginale. On distingue de part et d'autre du canal endocervical une zone hyperéchogène correspondant à «cervical gland area ». (Auteur : Pr D.Subtil)

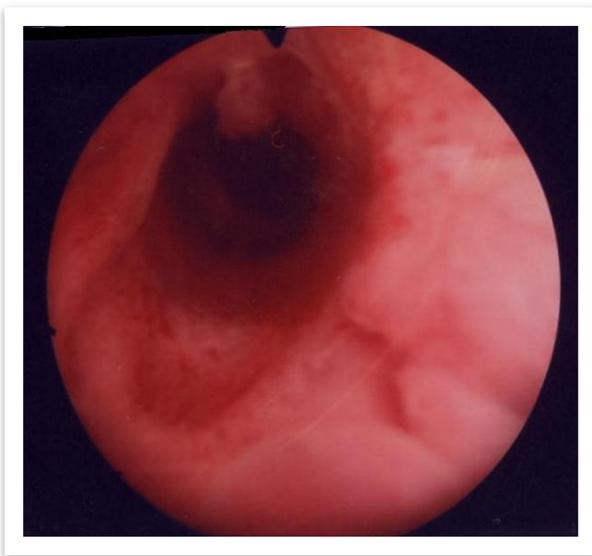
## **Le canal endocervical**

### *1. Embryologie :*

Les cellules bordant le canal endocervical ont la même origine mésodermique que l'ensemble des structures du col.

### *2. Anatomie :*

Le canal endocervical est réel (figure 5) et fusiforme. Ses parois antérieures et postérieures sont marquées par la présence du pli palmé <sup>[14,35]</sup> (figure 6) formé d'une colonne longitudinale d'où partent des plis transversaux. L'extrémité supérieure, appelée orifice interne, se prolonge avec l'isthme utérin. L'orifice externe est punctiforme chez la nullipare et puis s'allonge transversalement en formant une lèvre antérieure et postérieure chez la multipare <sup>[14]</sup>. Ce canal est droit dans un plan sagittal et fusiforme dans le plan frontal <sup>[15]</sup>.



*Figure 5 : Défilé endocervical en hystéroscopie. (Auteur: Dr D.Ledu)*



Figure 6 : Coupe macroscopique longitudinale de col utérin d'une femme en période d'activité génitale. Pli palmé. (Auteur : Dr H. Franquet)

### 3. Histologie :

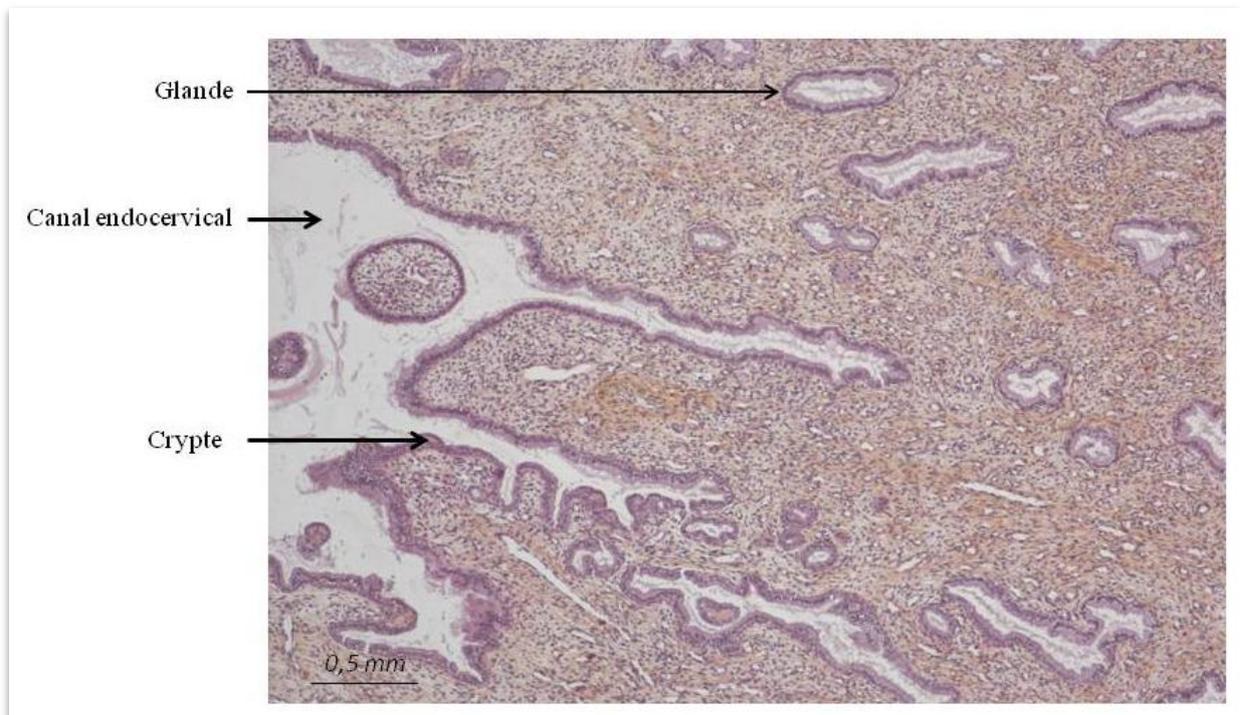
Le canal endocervical se replie en de nombreuses cryptes appelées « glandes » par abus de langage. Ces cryptes sont ramifiées et leurs lumières se rejoignent pour se jeter dans le canal endocervical (figures 7 et 8). Leur invasion normale dans la partie superficielle du chorion n'excède pas 7 mm <sup>[35]</sup>. Un épithélium muco-sécrétant tapisse l'ensemble de ce canal. Les cellules sont capables, sous influence hormonale, de modifier la qualité et la quantité de leurs sécrétions (figures 9 et 10) et sont parfois gorgées de mucus, qu'elles excrètent au pôle apical. En revanche, cet épithélium ne subit pas la même desquamation cyclique que l'endomètre. On trouve de rares cellules ciliées (figure 11). Les kystes glandulaires, encore appelés œufs de Naboth, correspondent à des glandes endocervicales dilatées, suite à l'obstruction de la lumière d'un canal excréteur (figure 12).

L'épithélium endocervical est unistratifié, formé de cellules cylindriques à noyau basal (figures 13 14 et 15) avec un stroma sous-jacent riche en fibroblastes et en collagène (figure

16) <sup>[16]</sup>. A la jonction endo-exo-cervicale, l'épithélium se transforme en épithélium malpighien pavimenteux pluristratifié, également aglandulaire.

Les illustrations suivantes ont été réalisées avec une coloration HPS (Hémalun, Phloxine, Safran). Il s'agit d'une coloration histologique topographique standard, associant à une coloration nucléaire par l'hémalun (violet), une coloration cytoplasmique par la phloxine (rose) et une coloration du collagène par le safran (orangé). C'est une coloration trichromique.

(Auteur : Dr I.Farré)



*Figure 7 (GR x 2) : Le canal endo-cervical se replie en de nombreuses « cryptes », appelées encore « glandes » lorsque la coupe histologique passe par un plan transversal. Leurs lumières sont ramifiées et se rejoignent pour se jeter dans le canal endo-cervical.*

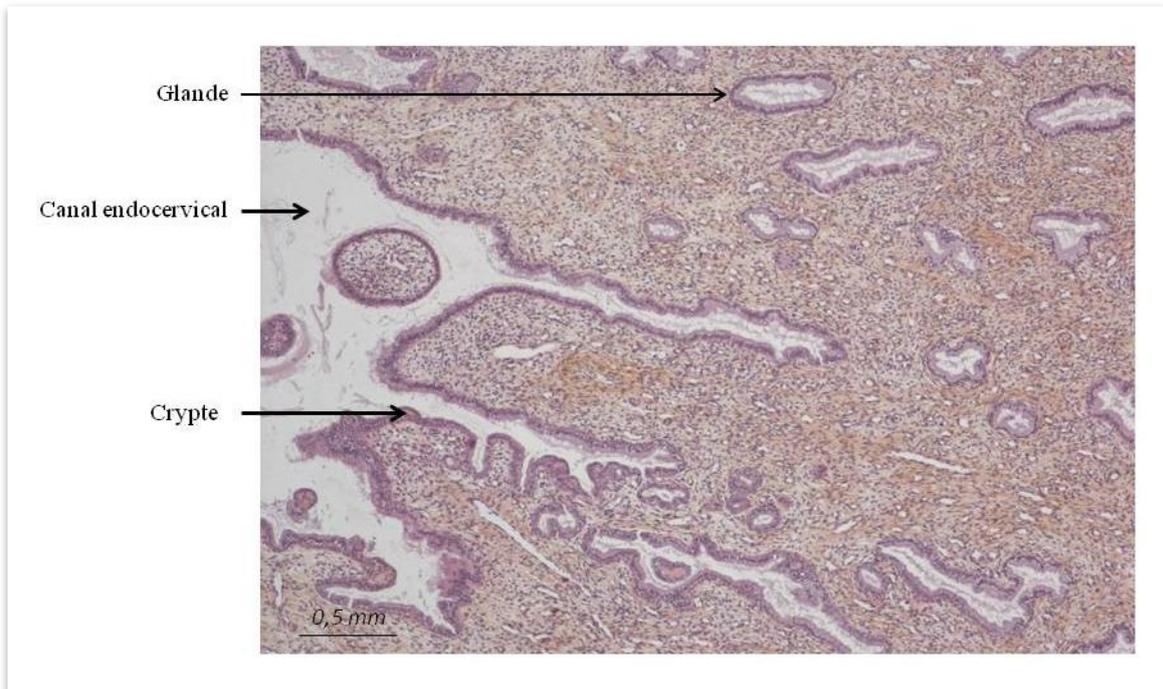


Figure 8 (GR x 4) : « Cryptes » et « Glandes »

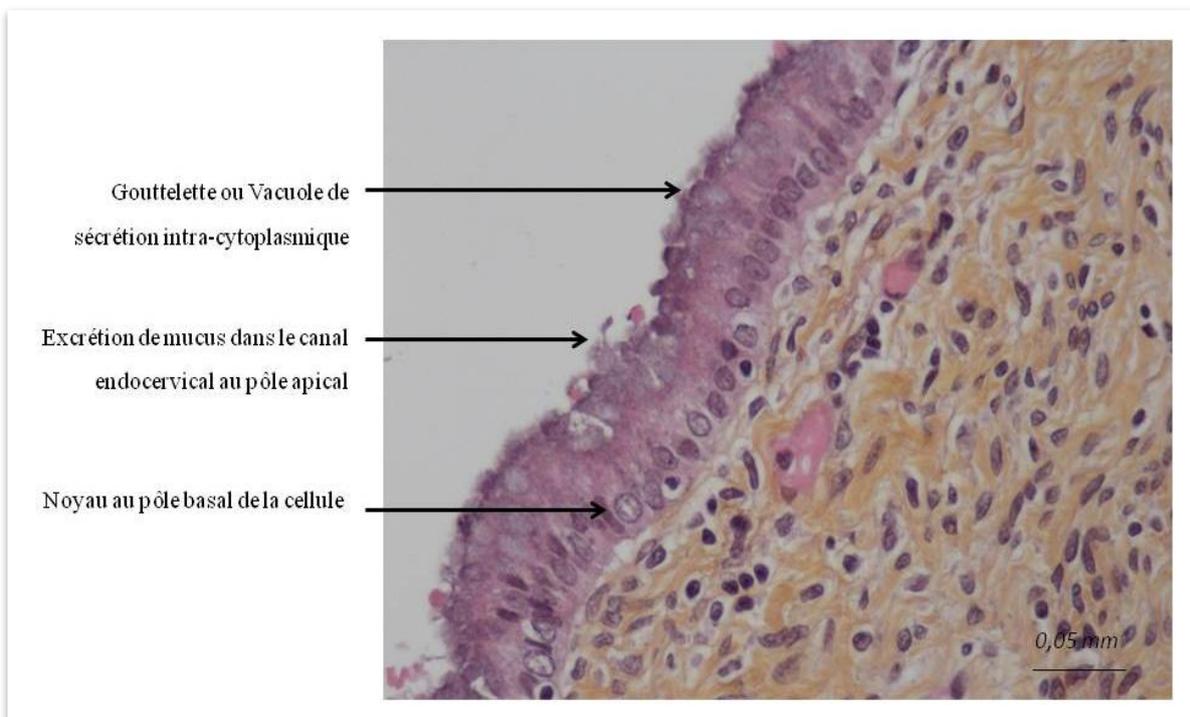


Figure 9 (GR x 40) : Les cellules épithéliales sécrètent, sous l'influence des œstrogènes, un mucus fluide laissant passer les spermatozoïdes.

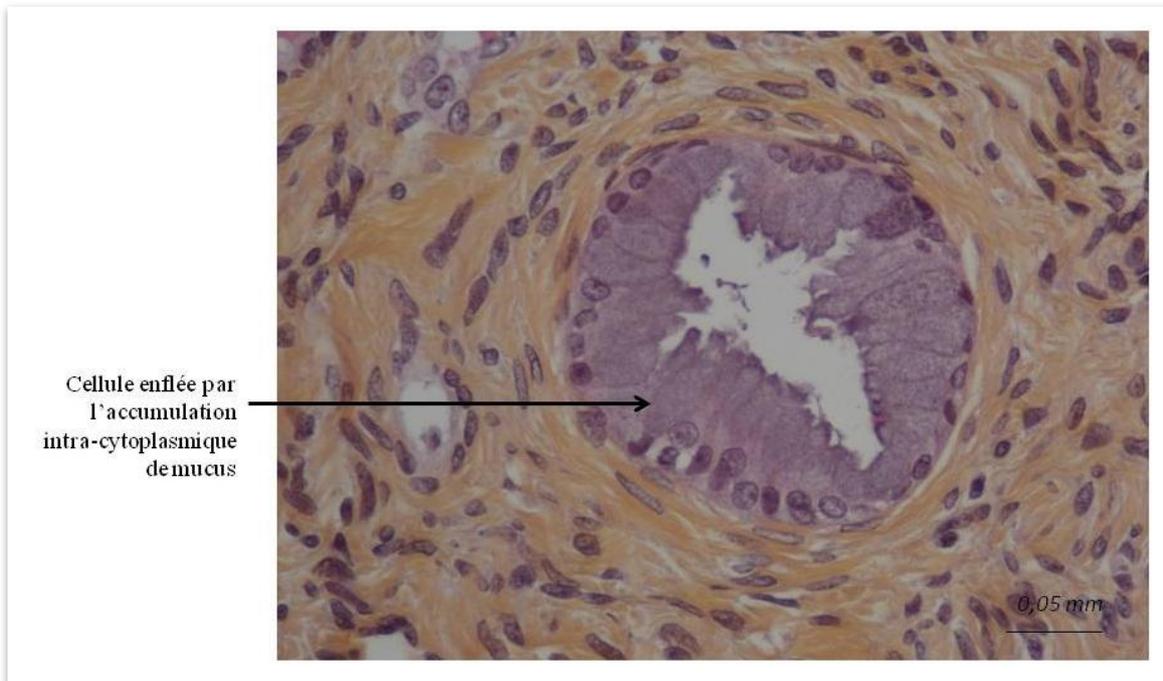


Figure 10 (GR x 40) : Glande bordée de cellules épithéliales gorgées de mucus

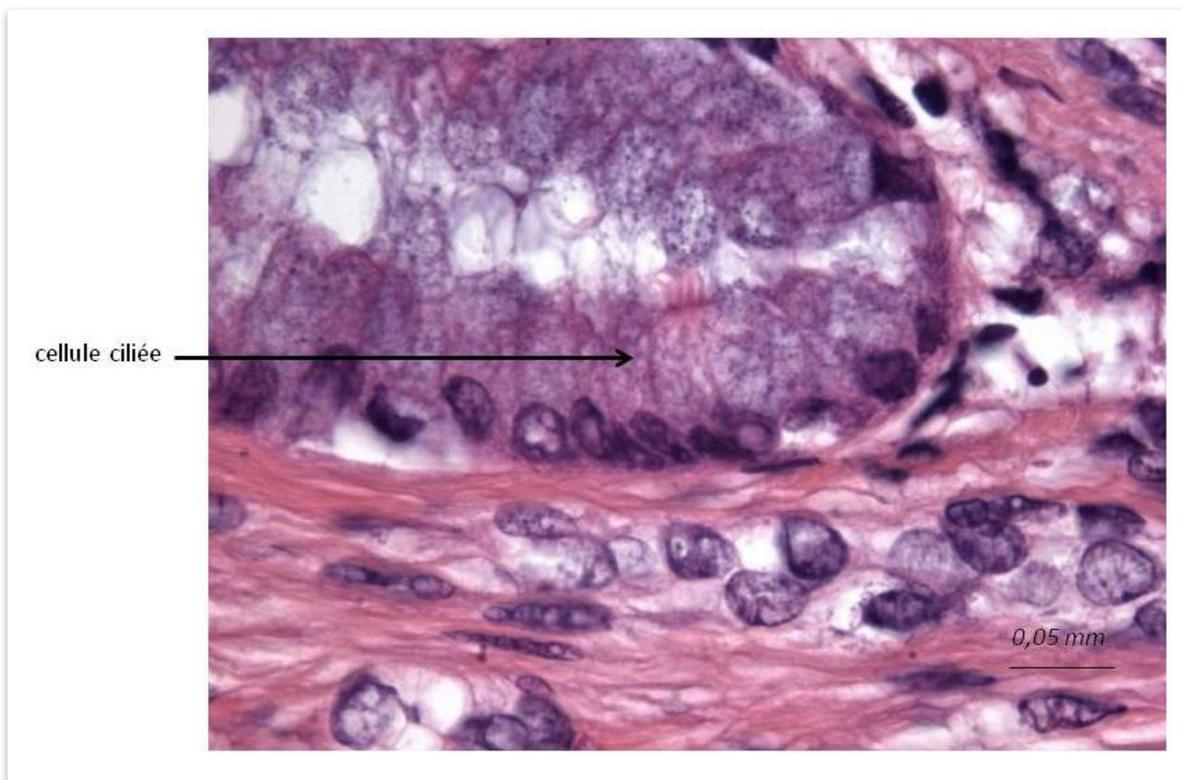
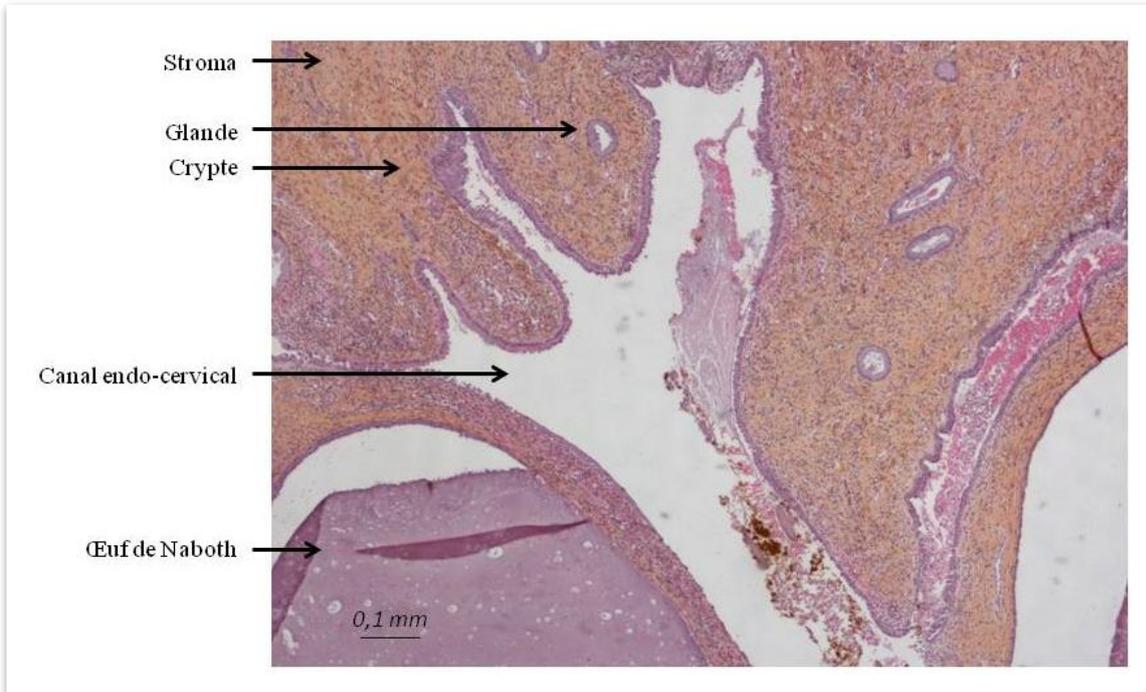
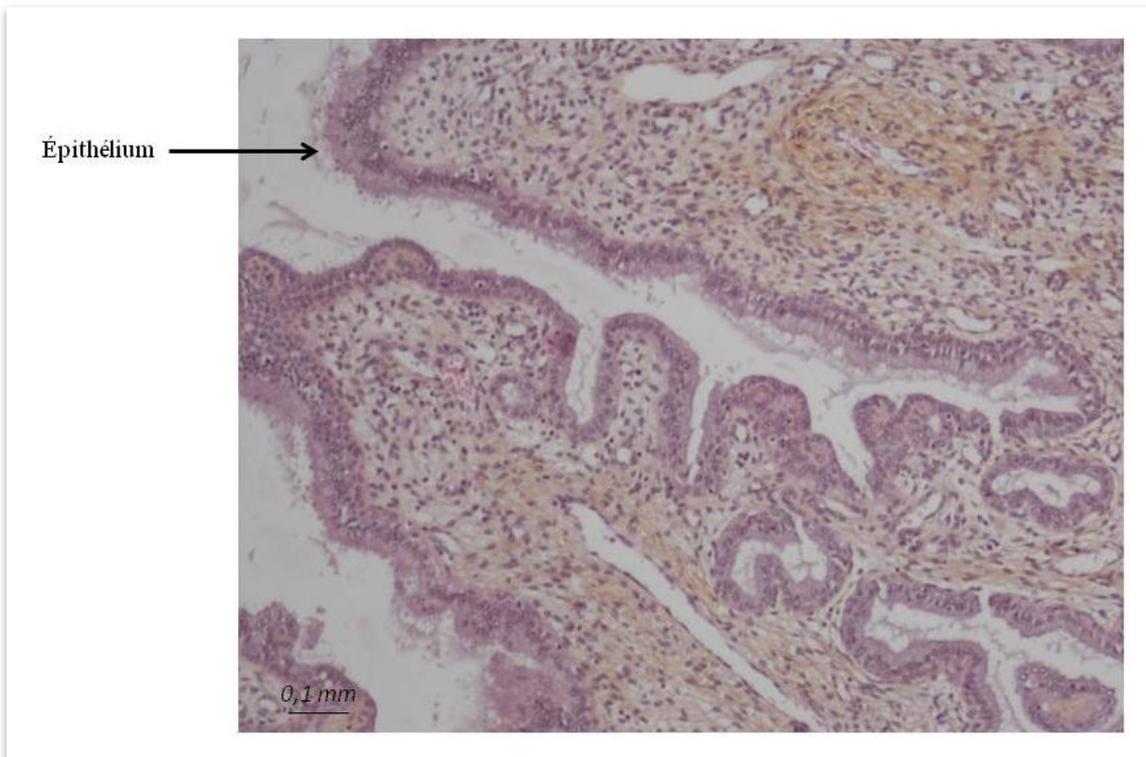


Figure 11 (GR x 40) : Glande endocervicale comportant une rare cellule ciliée. Coloration HES (Hématoxyline Erythrosine Safran), (Auteur : Dr Hélène Franquet).



*Figure 12 (GR x 10): Kyste ou œuf de Naboth correspondant à une glande endocervicale dilatée, suite à l'obstruction de la lumière d'un canal excréteur.*



*Figure 13 (GR x 10) : Le canal endocervical et ses nombreuses invaginations sont recouverts d'un épithélium glandulaire unistratifié*

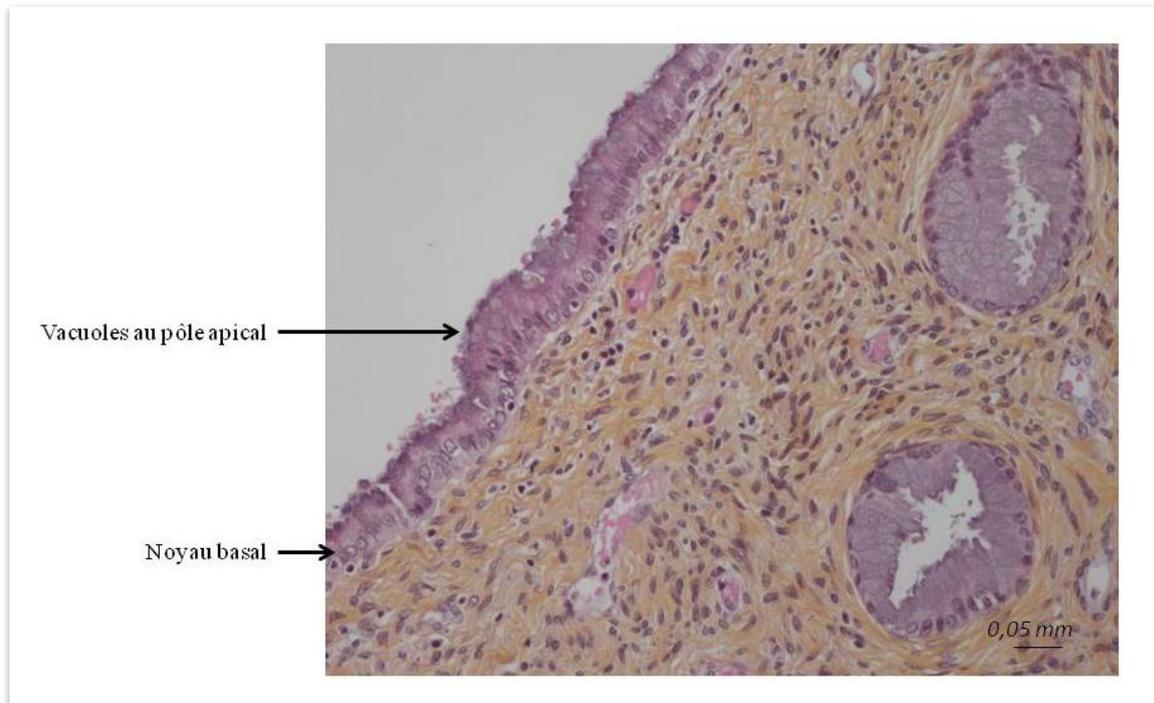


Figure 14 (GR x 20) : Il s'agit de cellules cylindriques mucosécrétantes, orientées avec un noyau basal et l'accumulation de vacuoles intra-cytoplasmiques au pôle apical.

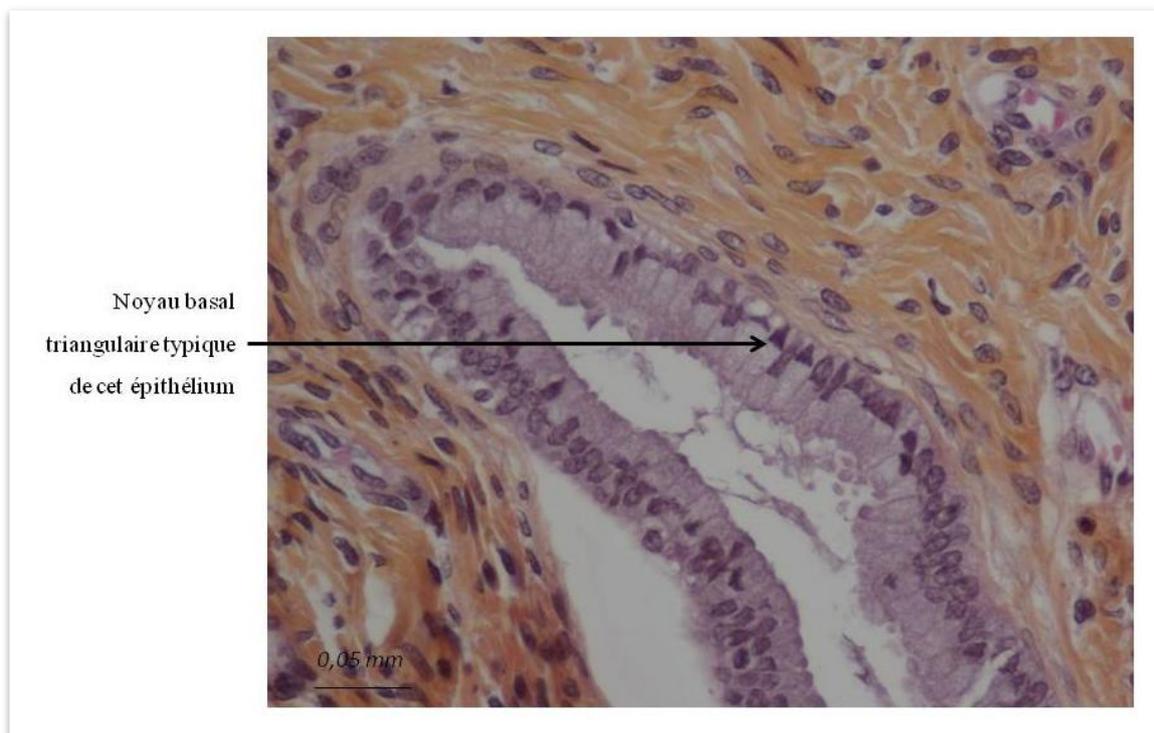


Figure 15 (GR x 40) : Extrémité d'une crypte

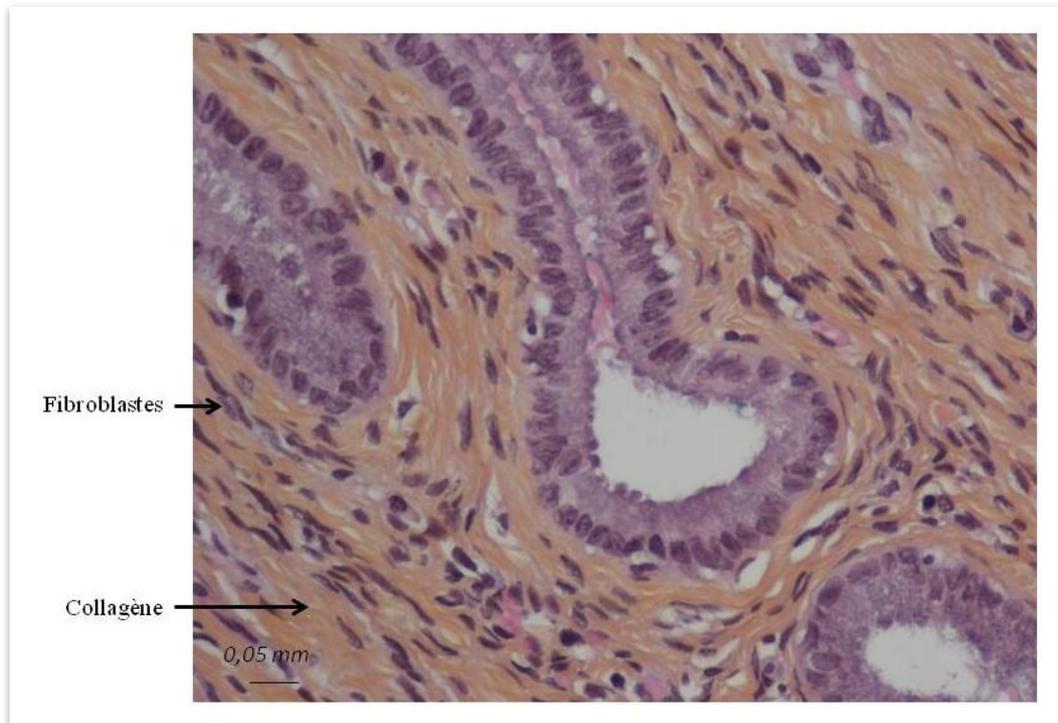


Figure 16 (GR x 20) : Extrémité d'une crypte. Chorion sous-jacent.

#### 4. Fonctions/ propriétés :

##### Barrière mécanique

L'épithélium joue le rôle de véritable barrière mécanique entre le canal endocervical et le stroma sous-jacent. Les « jonctions serrées » (tight junctions) sont faites de protéines transmembranaires, créant des liens solides imperméables au pôle apical de deux cellules adjacentes : il s'agit d'une barrière para-cellulaire. Ces jonctions facilitent le passage intercellulaire de nombreuses molécules et sont responsables de l'homéostasie des tissus <sup>[30]</sup>. Elles ont également une fonction primordiale dans la défense du tissu sous-jacent <sup>[36]</sup>. Chez la souris, en deuxième partie de gestation, lorsque le col se ramollit, l'expression de gènes liés à l'épithélium endocervical indique le rôle important potentiel de celui-ci dans le maintien d'une barrière immunologique capable de protéger le stroma sous-jacent <sup>[30,31]</sup>.

### Immunité

Comme dans beaucoup de systèmes biologiques, l'épithélium endocervical est la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Lors de la grossesse, cet épithélium permet la protection du stroma cervical et du haut appareil génital. Ce rôle est accentué pendant le travail et le post-partum, où le col ouvert devient un environnement très vulnérable.

In vitro, les cellules épithéliales exo et endocervicales, soumises à une agression bactérienne, sécrètent des cytokines (les interleukines 6 et 8). Par ailleurs, on observe une diminution de la cohésion cellulaire : la perméabilité de la barrière épithéliale augmente, pouvant aller jusqu'à être interrompue, permettant alors le passage des bactéries, de l'eau ou de médiateurs de l'inflammation dans le stroma sous-jacent. Ces phénomènes entraînent une réponse inflammatoire locale responsable de modifications cervicales<sup>[37]</sup>.

L'administration de corticoïdes bloque la sécrétion de cytokines, diminue la perméabilité cellulaire au niveau des cellules exocervicales mais pas endocervicales<sup>[37]</sup>. L'injection de corticoïdes dans la menace d'accouchement prématuré pourrait ainsi jouer aussi un rôle anti-inflammatoire au niveau cervical.

### Sécrétion du mucus

Les cellules de l'épithélium endocervical sont mucosécrétantes. Nous développerons cet aspect dans le chapitre suivant.

## **Le bouchon muqueux**

### *1. Origine :*

Le bouchon muqueux est sécrété par l'épithélium glandulaire endocervical, en fonction de son imprégnation hormonale. Il s'agit de sécrétions plus ou moins fluides chez la femme non enceinte, évoluant au cours du cycle menstruel ; et se transformant en un bouchon semi-solide

qui occlue le canal endocervical pendant la grossesse (figure 17) <sup>[38]</sup>. A terme, il forme une structure visqueuse, polarisée avec une partie utérine translucide et une partie vaginale plus foncée et opaque. Il pèse entre 3 et 18 grammes <sup>[39]</sup>. Hansen ne retrouve pas de différence, en histologie standard et en immuno-histochimie dans la quantité et la composition cellulaire des bouchons muqueux chez la femme enceinte entre leur partie distale et proximale <sup>[11]</sup>.



Figure 17: Photographie d'un bouchon muqueux à terme. D'après Becher et al. <sup>[10]</sup>

## ***2. Composition/propriétés physico-chimiques :***

Le bouchon muqueux est composé par de la mucine, de l'acide hyaluronique, et des protéoglycanes. On y retrouve par ailleurs de l'eau, et de nombreuses cellules et molécules liées au système immunitaire local (cytokines, anticorps...).

La molécule « clé » est la mucine, fabriquée par les cellules sécrétoires au sein du canal endocervical. Sa concentration et sa composition sont influencées par les hormones stéroïdes <sup>[40]</sup>. Elle est composée par une « core protéine » associée à des polysaccharides <sup>[10]</sup>.

De manière générale, on en trouve plusieurs sous-types dans les mucus recouvrant les épithéliums de surface de l'organisme. Ce sont également des protéines transmembranaires

exprimées à la surface apicale des cellules de certains épithéliums glandulaires et canaux  
[41].

Dans l'endocol, la mucine joue un rôle d'hydratation : elle retient l'eau au sein du bouchon muqueux. Elle sert de ligand pour les lectines, les molécules d'adhésion, facteurs de croissance, cytokines, chemokines. Sa structure permet l'exclusion stérique (en fonction de la taille) des grosses molécules et des bactéries (rôle certainement primordial dans la prévention de l'infection ascendante). Ses polysaccharides (charge négative) retiennent les molécules de charge positive (figure 18). Elle joue un rôle dans l'inhibition de la réplication virale (pox virus et VIH). Cette molécule est capable de s'associer avec un domaine transmembranaire transmettant ainsi une information sur l'état du mucus [10].

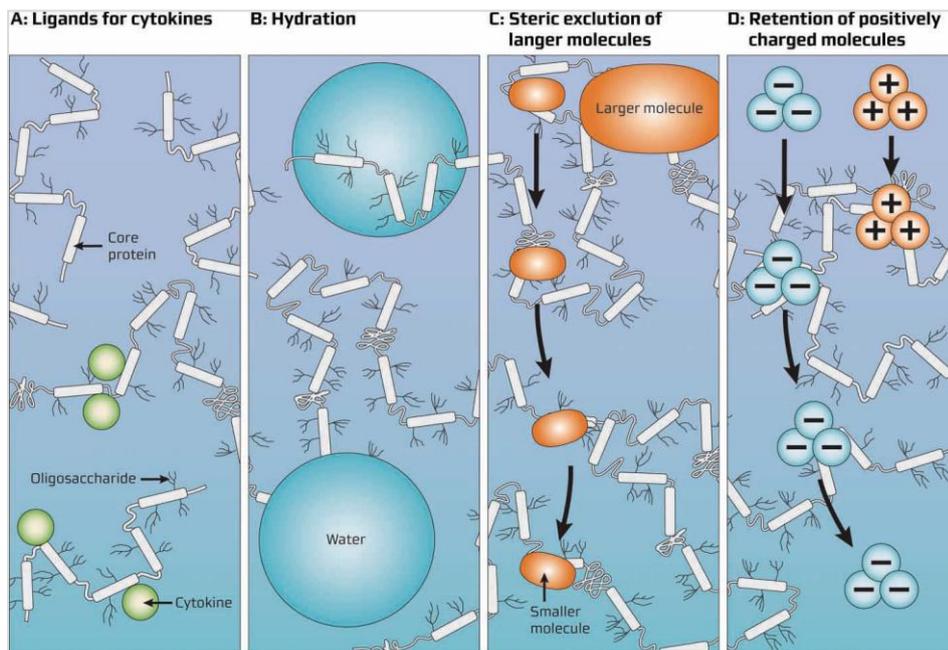


Figure 18 : Les quatre fonctions importantes de la mucine. (A) Ligand : les mucines sont des ligands pour les lectines, les molécules d'adhésion, les facteurs de croissance, les cytokines et les chémokines. (B) Hydratation : les mucines retiennent l'eau au sein du bouchon muqueux et déterminent le « state » d'hydratation. (C) Exclusion stérique : les mucines excluent les grosses molécules et les bactéries, elles empêchent donc leur diffusion dans le bouchon muqueux. Les petites molécules diffusent plus librement. (D) Rétention des molécules de charge positive Les oligosaccharides, chargés négativement repoussent les molécules de même charge mais laissent passer les molécules de charge positive. D'après Becher et al. [10]

Les protéoglycanes et les glycoaminoglycanes, dont l'acide hyaluronique, participent à l'élaboration du bouchon muqueux. L'acide hyaluronique a une concentration plus forte dans le bouchon muqueux pendant la première phase du travail qu'avant terme <sup>[26,32]</sup>. De même, au niveau du tissu cervical, son poids moléculaire est significativement diminué pendant la première phase du travail par rapport à une semaine avant et la concentration en hyaluronidase est significativement plus importante <sup>[26]</sup>.

Les cellules inflammatoires sont nombreuses. Il s'agit en majorité de polynucléaires neutrophiles et de macrophages. Des lymphocytes B et T peuvent aussi être présents. Il n'existe pas de différence de composition cellulaire au premier et au troisième trimestre de la grossesse. <sup>[11]</sup>

Le bouchon muqueux contient une foule de facteurs inflammatoires. Dans le cadre de l'immunité innée (processus rapide et non spécifique de lutte contre les pathogènes), les neutrophiles sécrètent de nombreux « peptides anti-microbiens » (figure 19) : lactoferrine, SPLI (secretory leukoprotease inhibitor), lysozyme, calprotectine, alfa-défensine ( $\alpha$ -defensins human neutrophil peptides 1 to 3 (HNP1-3)), bêta-défensine (human  $\beta$ -defensins 1 to 3 (HBD-1-3)) ... Bactéricides pour beaucoup de bactéries gram positives et négatives, ils sont dispersés dans le milieu intra et extracellulaire <sup>[10,38]</sup>. La teneur en peptides anti-microbien est similaire dans le bouchon muqueux à terme et dans les sécrétions nasales. Il s'agit dans les deux cas de séparer un environnement externe riche en agents pathogènes d'un organe interne stérile (l'utérus ou le poumon) <sup>[10,42]</sup>.

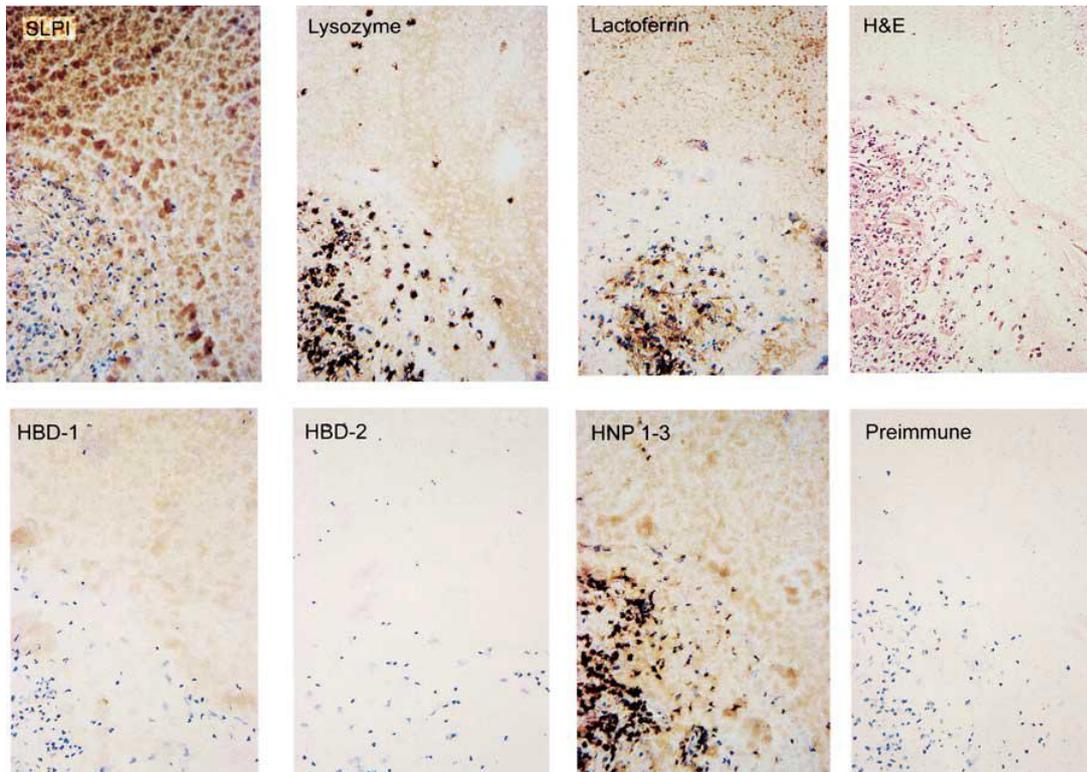


Figure 19 : Distribution des peptides antimicrobiens dans le bouchon muqueux. Les bouchons ont été colorés avec soit de l'hématoxyline et de l'éosine soit avec les anticorps dirigés contre les polypeptides antimicrobiens indiqués. Les zones immunoréactives sont brunes, et la coloration standard est bleue. D'après Hein et al. 2002<sup>[38]</sup>

L'immunité acquise est un processus lent dont le principe est la fabrication d'anticorps ou de lymphocytes spécifiques d'un antigène donné. Ces anticorps sont sécrétés dans l'espace extracellulaire, leur fixation sur un pathogène spécifique active la cascade du complément conduisant à la lyse cellulaire. Chez la femme enceinte, le taux d'IgG et IgA au sein du bouchon muqueux est 6 à 16 fois plus élevé. Les IgA augmentent au 3<sup>ème</sup> trimestre alors que les IgG restent stables.

### 3. Fonctions :

#### Fertilité

En dehors de la grossesse, la glaire cervicale joue de nombreux rôles physiologiques. Elle protège le sperme de l'environnement hostile du vagin et de la possibilité de phagocytose par

les cellules de la lignée blanche dans le canal endocervical, elle facilite le passage des spermatozoïdes pendant la période ovulatoire et complète les besoins en énergie avant la phase d'ascension des voies génitales hautes. Elle joue le rôle de filtre cellulaire pour les plus déficients. Elle devient, de manière cyclique, pendant la phase lutéale, sous l'influence de la progestérone, un véritable obstacle à leur passage <sup>[43]</sup>. Sous l'influence œstrogénique, en première partie de cycle, la glaire au départ non visible, devient cliniquement jaune épaisse et collante puis plus transparente, humide et extensible <sup>[44]</sup>. Au moment de l'ovulation, ce phénomène est connu en terme de rhéologie médicale sous le nom de « spinnbarkeit » <sup>[45]</sup>. La probabilité de conception est la plus forte le jour où la qualité de la glaire est la plus adéquate, indépendamment du jour de l'ovulation <sup>[44]</sup>

C'est sur cette physiologie que reposent les méthodes de régulation des naissances dites « naturelles », notamment la « méthode Billings » ou plus récemment la « NaProTechnologie » (Natural Procreative Technology), pour laquelle le but est d'optimiser les conditions de fécondation in vivo chez les couples hypofertiles <sup>[46]</sup>. L'observation de la glaire cervicale durant son cycle permet à la patiente de reconnaître la période de fertilité, afin d'éviter ou de favoriser une grossesse <sup>[47,48]</sup>.

### Barrière physique

La mucine joue le rôle de barrière physique contre les micro-organismes. Ses propriétés physiques, chimiques, rhéologiques subissent de profondes modifications pendant la phase ovulatoire du cycle menstruel. Juste avant l'ovulation, la viscosité diminue facilitant le passage des spermatozoïdes. Ces variations sont liées au changement de structure de la mucine, notamment sous influence du pH. En effet, pendant la période péri-ovulatoire, le pH est relativement haut, la diminution artificielle du pH au sein de bouchons muqueux pendant cette période entraîne une agrégation des molécules de mucine <sup>[40]</sup>

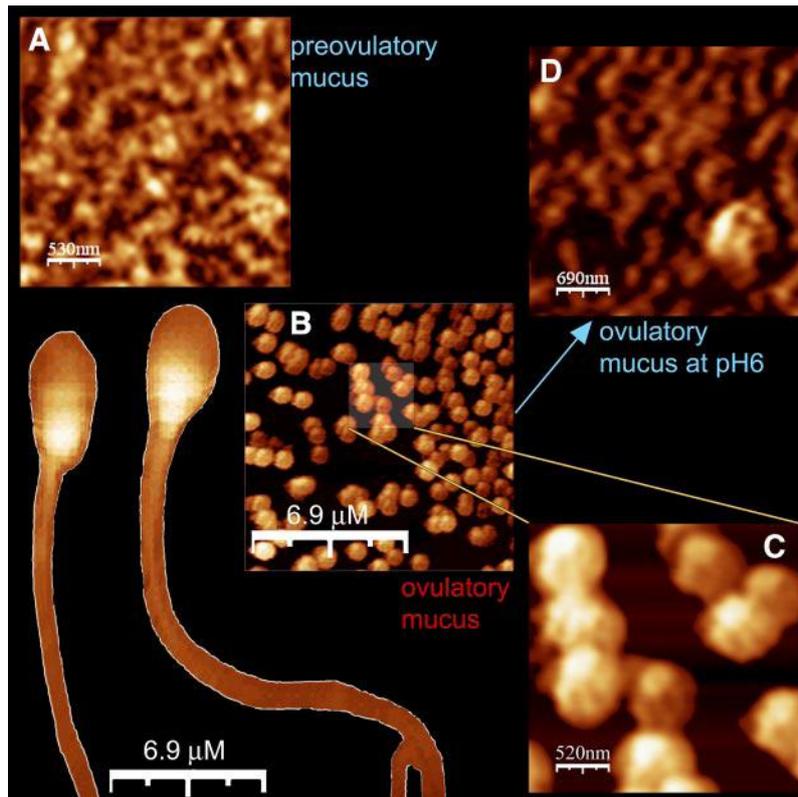


Figure 20 : Modifications de structure de la glaire cervicale au cours du cycle menstruel de la femme. Image (A) : glaire pré-ovulatoire, (B) : glaire ovulatoire avec agrandissement (C), (D) : glaire ovulatoire à pH 6. Représentation de deux spermatozoïdes pour faciliter la comparaison avec le même agrandissement qu'en (B). D'après Brunelli et al.<sup>[40]</sup>

Les propriétés visco-élastiques des bouchons muqueux des patientes à risque d'accouchement prématuré (symptomatiques) sont altérées par rapport à des patientes contrôle au même terme [45].

Becher et al. proposent de fabriquer un bouchon muqueux artificiel (avec des propriétés antibactériennes) chez ces patientes ayant un bouchon muqueux « défectueux ».

### Barrière immunologique

La forte concentration en molécules immunologiques lui confère une activité antibactérienne efficace. Eggert-Kruse et al. ont testé cette activité antibactérienne sur 133 bouchons muqueux prélevés sur des femmes en milieu de cycle, infertiles, avec une activité sexuelle <sup>[49]</sup>

Ils concluent que le pH endocervical n'est pas corrélé avec l'activité antibactérienne, mais que la présence de sperme augmente cette activité. Les bouchons muqueux « infectés » ont une activité antibactérienne moins forte que les bouchons muqueux stériles ( $p < 0.005$ ) [49].

Hein et al. ont étudié 56 bouchons muqueux chez des patientes en fin de grossesse (figure 20) : Ces derniers inhibent complètement la croissance de *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. En fonction des patientes, il existe une inhibition partielle ou complète pour *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus Agalactiae*, *Enterococcus faecium*, et *Staphylococcus aureus* [39].

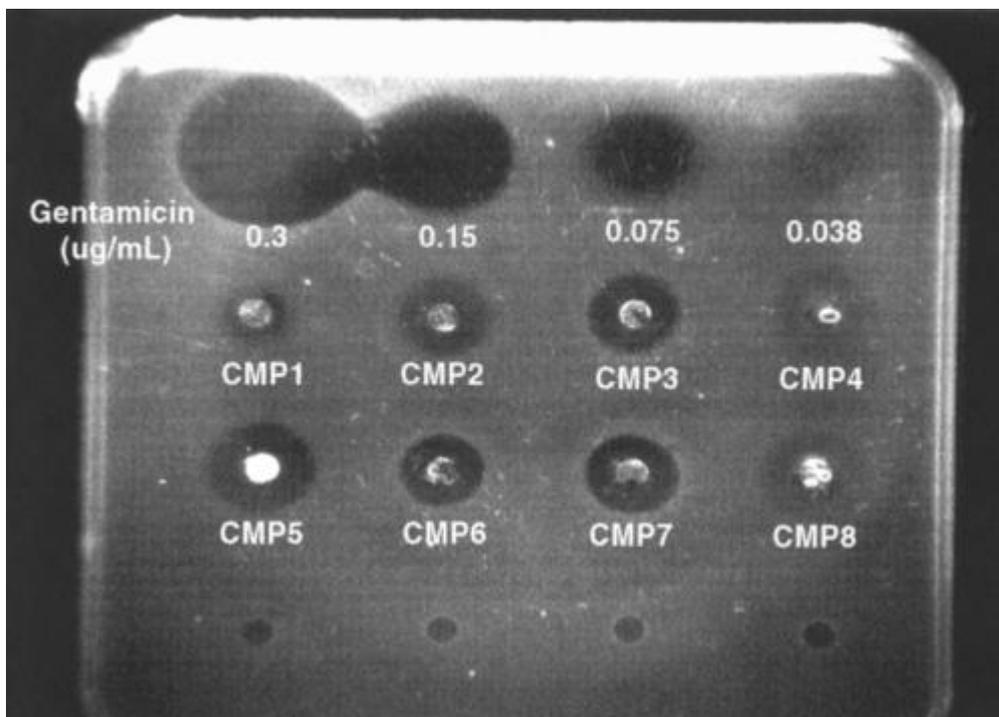


Figure 21: Test de diffusion radiale de l'activité anti-microbienne de bouchons muqueux contre le Streptocoque B. Photographie d'une plaque de gélose avec le test de diffusion radiale. Comparaison avec les standards de gentamycine. D'après Hein et al. [39]

#### 4. Bio-marqueurs endocervicaux et prématurité :

Vogel et al. rapportent une synthèse des marqueurs cervicaux étudiés et informatifs en cas d'accouchement prématuré. En présence de symptômes, on retrouve la triade interleukine 6,

interleukine 8 et longueur cervicale ; la fibronectine seule ; l'association fibronectine et longueur cervicale ; l'interleukine 6 seule. En l'absence de symptômes, l'interleukine 6, la fibronectine, la ferritine, semblent être des biomarqueurs intéressants <sup>[50]</sup>.

La fibronectine fœtale est une glycoprotéine sécrétée entre les deux membranes amniotiques. Elle n'est pas sécrétée habituellement après 24 SA. La recherche de la fibronectine fœtale dans les sécrétions cervico-vaginales a une valeur prédictive négative forte pour le diagnostic d'accouchement prématuré (si elle est absente, 1% d'accouchement prématuré dans les sept jours) alors que sa valeur prédictive positive n'est que de 40 % <sup>[7]</sup>. Pour Goldenberg et al., la fibronectine présente dans les sécrétions cervicales est prédictive de l'accouchement prématuré et fortement associée à la chorioamniotite et au sepsis néonatal <sup>[5]</sup>. Dans ce cadre, Rizzo et al. avance un taux seuil de 60 ng/ml <sup>[51]</sup>.

La présence de certains marqueurs de l'inflammation, notamment les interleukines 6 et 8 est augmentée de manière significative au sein du liquide amniotique chez les patientes ayant accouché prématurément <sup>[52-54]</sup>.

L'interleukine 6 cervicale élevée serait prédictive de l'accouchement prématuré <sup>[5]</sup>. Dans l'étude de Rizzo et al., les taux d'IL6 et IL1-récepteur présents dans les sécrétions cervicales chez les patientes admises pour menace d'accouchement prématuré sont significativement plus élevés lorsqu'il existe une culture de liquide amniotique positive (sensibilité 67% ; spécificité 90% ; risque relatif 7.7) <sup>[51]</sup>. Pour d'autres auteurs également, il existe une relation entre augmentation de l'IL6 et 8 dans sécrétions cervicales et infection intra-amniotique et accouchement prématuré <sup>[55]</sup>. L'IL6 est associée à la vaginose bactérienne et semble être un marqueur de l'inflammation précoce <sup>[9]</sup>. Pour Lange et al., en cas de menace d'accouchement prématuré, l'IL6 dans les sécrétions cervicales est de manière significative plus élevée chez

les patientes qui vont accoucher avant 34 SA<sup>[56]</sup>. Pour conclure, l'IL6 cervicale semble être un bon reflet des événements infectieux intra-amniotiques<sup>[10]</sup>.

Pour l'IL8, les études sont discordantes. Elle aurait une augmentation plus tardive dans le mécanisme d'inflammation locale et donc présenterait moins d'intérêt dans la détection initiale d'une infection du tractus génital<sup>[9]</sup>. En revanche, la présence d'IL 18 dans les sécrétions cervicales ne peut servir de marqueur prédictif d'accouchement prématuré ou d'invasion bactérienne du liquide amniotique<sup>[57]</sup>.

Les modifications cervicales dans l'accouchement prématuré et l'accouchement à terme sont des mécanismes similaires, cependant initiés par des médiateurs cellulaires différents. Le travail prématuré fait intervenir des molécules du complément (C5a). Les métalloprotéases sont sécrétées par les macrophages. A terme, ce sont les fibroblastes et les cellules épithéliales qui sécrètent cette enzyme de dégradation du collagène, certainement sous l'influence de la progestérone<sup>[58]</sup>.

D'autres molécules ont été étudiées dans les sécrétions endocervicales chez la femme enceinte asymptomatique : la ferritine, alpha-foeto-protéine, l'hcg, la prolactine, la partie C-terminale du procollagène<sup>[59]</sup>, l'alpha-défencine, la lactoferrine et l'élastase<sup>[9]</sup>, certaines protéinases (la granulocyte élastase, la neutrophile collagenase, et la gélatinase B) et des inhibiteurs des métalloprotéases<sup>[60]</sup>. In vitro : la desmoplattine isoform-1, la stratifine, la thromboplastine-1 précurseur ont été testées<sup>[61]</sup>.

Actuellement, aucun marqueur inflammatoire ne s'est révélé suffisamment spécifique pour avoir une application pratique dans la détection précoce du travail prématuré.

## **Microbiologie/bactériologie du canal endocervical**

### *1. Problèmes associés au prélèvement endocervical chez la femme enceinte :*

#### *Innocuité du prélèvement :*

Il existe une dimension éthique : effectuer un tel prélèvement chez une patiente enceinte peut avoir des conséquences potentiellement néfastes : menace d'accouchement prématuré, rupture prématurée des membranes, chorioamniotite, malformation... Le col doit être manipulé avec précaution. Les études sur les prélèvements endocervicaux pendant la grossesse ne précisent pas la survenue ou non d'effet indésirable. Seuls Holst et al. et Sawada et al. rapportent l'absence d'effet indésirable <sup>[9,55]</sup>. Imudia et al., dans une revue de la littérature sur les techniques mini-invasives trans-cervicales permettant de récupérer des cellules fœtales de façon similaire, ne rapportent pas d'effet indésirable, hormis de très rares cas de fausse couche ou de malformation <sup>[58]</sup>.

#### *Mode de prélèvement :*

La méthode de prélèvement de l'endocol n'est pas toujours définie dans les études sur ce sujet, alors qu'il s'agit d'un élément primordial. Certains auteurs utilisent une brosse, d'autres un simple écouvillon intra-cervical avec une « absorption passive » <sup>[9]</sup> (voir tableau 1). Il en est de même pour la profondeur du prélèvement, notion quasiment absente des études répertoriées. Seuls Hansen et al. ont comparé des prélèvements endocervicaux à 1 et 3 cm <sup>[11]</sup>.

Contamination par la flore vaginale/ conditions du prélèvement :

Il s'agit d'isoler uniquement la flore endocervicale sans contamination par la flore vaginale. Les études à ce sujet sont peu explicites (tableau 1). Un lavage préalable de l'exocol plus ou moins associé à une désinfection peut paraître justifié. De même, un prélèvement protégé, comme ceux réalisés en pneumologie semble intéressant pour s'affranchir de la flore vaginale.

On peut remettre en question de la pertinence des résultats compte tenu du fait que les auteurs ne précisent pas la méthodologie utilisée pour les prélèvements.

Etude	CPP	Terme	Symptômes	Asepsie	Matériel	PEP	Profondeur	Biologie moléculaire	EI
<b>Slotnick et al. 1963</b> <sup>[62]</sup>	No n	17 à 37 SA	Non	Lavage à l'eau	NP	NP	NP	Non	NP
<b>Svare et al. 1992</b> <sup>[63]</sup>	Oui	26 à 34 SA	Oui vs Non	NP	Ecouvillon en coton (imprégnés de charbon)	Non	NP	Non	NP
<b>Harisson et al. 1983</b> <sup>[64]</sup>	CP *	1 <sup>ère</sup> visite (<32SA) et entre 32/38 sa	Non	NP	Ecouvillon (Alginate de calcium)	Non	NP	Non	NP
<b>Lamont et al. 1988</b> <sup>[65]</sup>	NP	26 à 34 SA	Oui	NP	NP	NP	NP	Non	NP
<b>Polk et al. 1989</b> <sup>[66]</sup>	CP *	22 à 30 SA	Non	Lavage simple	Ecouvillon en dacron stérile imbibé d'une solution saline	Non	NP	Non	NP
<b>Horowitz et al. 1995</b> <sup>[67]</sup>	CP *	16 SA à terme	Oui vs Non	NP	Ecouvillon	NP	NP	Non	
<b>Aaltone et al. 2002</b> <sup>[68]</sup>	NP	22 à terme	Oui vs Non	NP	Ecouvillon	NP	NP	Oui	
<b>Silva et al. 2003</b> <sup>[69]</sup>	Oui	28 à 34	Oui vs Non	NP	Ecouvillon	NP	NP	Non	NP
<b>Holst et al. 2005</b> <sup>[55]</sup>	No n	22 à 34 SA	Oui	NP	Cytobrush Ecouvillon en coton	Non	Orifice externe	Oui	No n
<b>Sawada et al. 2006</b> <sup>[9]</sup>	Oui	6 A 36 SA	Oui vs Non	NP	Ecouvillon	Non	Non	Oui	No n
<b>Gonzalez et al. 2006</b> <sup>[70]</sup>	Oui	24 à 34 SA	Oui	NP	NP	NP	NP	Non	NP
<b>Médina et al. 2009</b> <sup>[71]</sup>	Oui	< 37 SA	Oui	NP	Ecouvillon stérile	Non	NP	Oui	NP
<b>Ramos et al. 2011</b> <sup>[72]</sup>					Cytobrush GT plus			Oui	
<b>Hansen et al. 2013</b> <sup>[11]</sup>	Oui	1 <sup>er</sup> T et terme	Non	Lavage simple	Aspigliaire	Non	1 et 3 cm	Oui	NP

Tableau 1 : Etudes portant sur des prélèvements endocervicaux pendant la grossesse à visée bactériologique. \* Consentement patiente

## *2. Microorganismes saprophytes du canal endocervical*

Avec les techniques de bactériologie standard, le canal endocervical était considéré comme un milieu physiologiquement stérile <sup>[43]</sup>.

Grâce à la biologie moléculaire, la présence de micro-organismes est presque détectée partout et conduit à redéfinir le principe de stérilité et la notion de « seuil bactériologique ». On peut aussi se poser la question d'une contamination, même infime, révélée par une technique extrêmement sensible.

La charge bactérienne globale au sein du bouchon muqueux dans le canal endocervical représente moins de 1% de celle du vagin <sup>[11]</sup>.

### Les lactobacilles :

Les lactobacilles (*L.jensenii*, *L.crispatus*, *L.iners*) sont présents de manière normale jusqu'à 4 cm dans l'endocol, en quantité significativement moins importante que dans le vagin. Les espèces *L.crispatus* et *L.jensenii* sont moins présentes dans la partie proximale que distale des bouchons muqueux. La concentration en lactobacilles, plus de 2900 fois plus importante que *Ureaplasma parvum*, pose la question de leur rôle protecteur <sup>[11]</sup>.

Silva et al. isolent dans 85,7 % des cas des lactobacilles dans les sécrétions cervicales de femmes enceintes asymptomatiques <sup>[69]</sup>. A l'inverse, il existe une diminution significative des lactobacilles dans les sécrétions cervicales chez les patientes ayant une rupture prématurée des membranes <sup>[63,69]</sup>.

La présence de ces lactobacilles est-elle la conséquence d'une contamination des prélèvements par la flore vaginale ? S'agit-il d'une présence normale dans le canal endocervical ? Dans ce cas, il convient de faire un parallèle avec leur fonction essentielle dans le vagin.

Autres microorganismes :

Dans les années 2000, *Ureaplasma urealyticum*, mis en cause depuis très longtemps pour sa relation avec l'accouchement prématuré d'origine infectieuse, a été divisé en sous espèces : *U. parvum* (antérieurement *U. urealyticum biovar 1*) and *U. urealyticum* (antérieurement *U. urealyticum biovar 2*) [73]. Dans les études antérieures, *U. parvum* était-il inclut dans *U. urealyticum* ou n'était-il pas détecté ?

*Ureaplasma parvum* est présent de manière normale dans le vagin [74]. Kong et al. le retrouvent dans 87% des cas chez la femme enceinte (19% *U. Urealyticum*). Il s'agit également de la bactérie la plus retrouvée en cas d'infection intra-amniotique [75]. Hansen et al. le trouvent dans l'endocol, y compris dans la partie proximale de patientes enceintes à terme. Par ailleurs, on peut retrouver chez ces patientes *Ureaplasma urealyticum* ou *Mycoplasma hominis* mais uniquement dans la partie distale [11].

Silva et al. rapportent l'ensemble des microorganismes isolés des sécrétions cervicales chez des patientes enceintes asymptomatiques (figure 22). Dans cette étude, les cultures de liquide amniotique sont stériles chez toutes ces patientes.

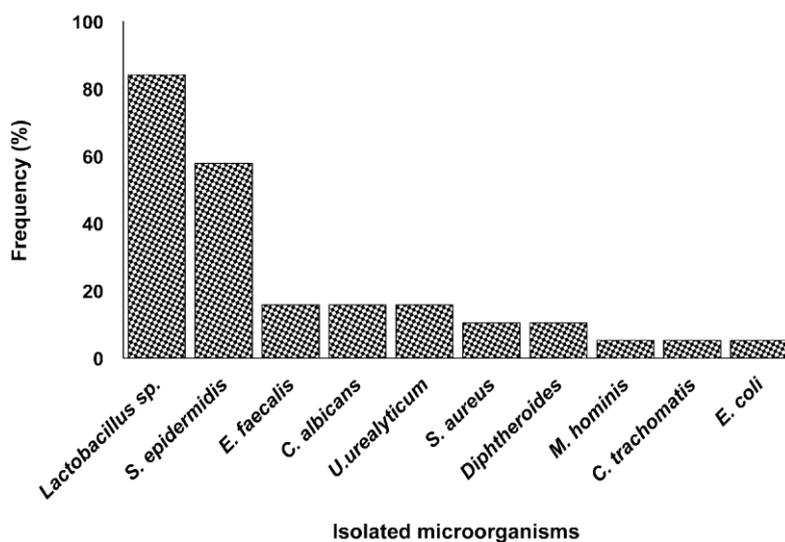


Figure 22: Fréquence des microorganismes isolés des sécrétions cervicales après culture chez des patientes enceintes asymptomatiques. D'après Silva et al [69].

### 3. *Microorganismes et pathologie infectieuse :*

A l'extrémité externe du canal endocervical, au niveau vaginal, les microorganismes retrouvés dans le contexte de prématurité d'origine infectieuse sont bien connus. Dans le cadre d'accouchements prématurés à membranes intactes il s'agit de : *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, streptocoque, bacteroïdes. Dans le cadre d'une rupture prématurée des membranes, on retrouvera préférentiellement le streptocoque B et *Escherichia coli* [5,76,77] .

Dans le canal endocervical, les connaissances est moins bien répertoriées. Holst et al. retrouvent les espèces bactériennes suivantes après culture standard : *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, streptocoque B, *Gardnerella vaginalis*, bacteroides. Ils ne retrouvent pas les mêmes germes dans les sécrétions cervicales et au sein du liquide amniotique dans le cadre d'accouchements prématurés [55] .

Pour Aaltone et al., la présence d'*Ureaplasma urealyticum* dans les sécrétions cervicales augmente d'un facteur 3.34 le risque d'accouchement prématuré [68] .

Pour Silva et al., les espèces retrouvées dans les sécrétions cervicales de patientes ayant une rupture prématurée des membranes sont répertoriées figure 23. *S. epidermidis* (45.9%), *S. aureus* (32.4%) and *C. albicans* (24.3%) prédominent.

La culture de liquide amniotique est positive dans 5,4 % des cas dans ce groupe : on retrouve la même espèce bactérienne dans le liquide amniotique et dans les sécrétions cervicales. Il s'agit de *M. hominis*, *U. urealyticum* ou diphtéroïdes.

Enfin, 20% de ces patientes n'ont pas de chorioamniotite histologique, la diversité des germes dans le canal endocervical est alors moindre dans ce sous-groupe : *S. aureus*, *U. urealyticum*, *S. agalactiae*, *M. hominis*, *G. vaginalis* ne sont jamais présents. *S. epidermidis* est fréquemment retrouvé mais n'est pas spécifique.

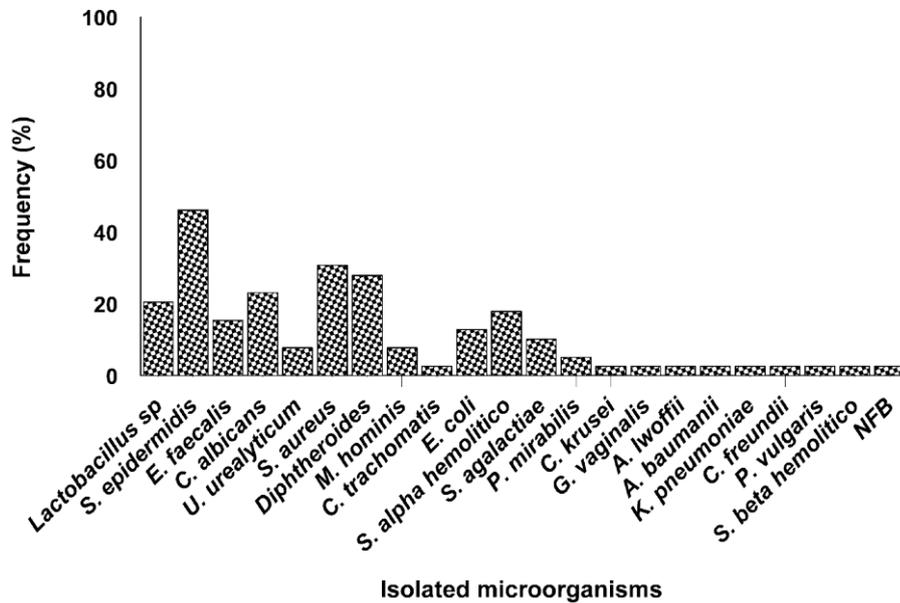


Figure 23: Microorganismes isolés des sécrétions cervicales après culture chez des patientes ayant une rupture prématurée des membranes. D'après Silva et al<sup>[69]</sup>

L'étude prospective sur 801 patientes de Polk et al. montrent que la colonisation de l'endocol par *M hominis* (OD=2, [IC 90%]= 1.42/2.93) et *C trachomatis* (OD=1,6 [IC 90%]= 1.01-2.50) est associée à l'accouchement prématuré.

A l'inverse, l'étude prospective de Harisson et al. sur 1365 patientes ne montre aucune corrélation entre *M hominis*, *C trachomatis*, *U urealyticum*, et accouchement prématuré ou rupture prématurée des membranes.

Il existe une notion d'inflammation endocervicale définie par une hyperleucocytose dans les sécrétions endocervicales chez 60 % des patientes admises pour un travail prématuré <sup>[78]</sup>.

Silva et al. retrouvent une incidence de chorioamniotite de 80% dans le groupe rupture prématurée des membranes, associé dans 75% des cas à une forte quantité de leucocytes dans

les sécrétions cervicales, alors les patientes du groupe contrôle, les leucocytes étaient le plus souvent rares ou absents (90,4%)<sup>[69]</sup>.

Le col utérin, centré par le canal endocervical est au cours de la grossesse, le siège de nombreuses modifications structurelles, biochimiques, immunologiques. Le bouchon muqueux joue un rôle essentiel de barrière physique et bactériologique.

## **2<sup>ème</sup> partie : Contribution à la recherche du meilleur matériel de prélèvement endocervical protégé**

Nous avons vu dans la première partie que les faiblesses des études antérieures sont l'absence de « standard de prélèvement » et l'absence de protection vis-à-vis du vagin. En outre, la méthode doit être simple et apporter un volume de prélèvement suffisant, en restant acceptable pour la patiente, sans danger pour la grossesse, et reproductible.

Afin de déterminer le meilleur matériel pour la réalisation d'un prélèvement endocervical protégé, nous avons réalisé une recherche « ad hoc », exploratoire et informelle chez des patientes consultant et/ou réalisant une interruption volontaire de grossesse (IVG).

### **Objectifs :**

Les objectifs de cette contribution étaient les suivants :

- Rechercher un matériel adapté à la femme enceinte (prélèvement et conditionnement), pour réaliser les différentes analyses - notamment en biologie moléculaire.
- Evaluer la faisabilité et la sécurité de différents modes de prélèvements.
- Evaluer le volume d'échantillon nécessaire pour avoir une information complète et fiable.
- Avoir une première idée du type d'information que l'on peut obtenir de tels prélèvements.

## Matériel et méthode :

### 1. Population :

Dans un premier temps, nous avons testé les différents types de matériel à notre disposition chez une patiente ayant recours à une IVG chirurgicale au bloc opératoire à 13+6 SA.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la méthode qui nous paraissait la plus adaptée chez trois patientes en consultation dont deux enceintes désirant bénéficier d'une IVG.

### 4. Matériel utilisé :

Nous avons sélectionné différents matériels, répondant aux critères que nous avons décrits plus haut (tableau 2) :

	<b>Aspilaire®</b> Longueur : 28 cm Ø externe : 2,92 mm
	<b>Endobrush®</b> Gaine : longueur : 23,5 cm ; Ø : 3,5 mm Brosse losangique : longueur : 2 cm Ø partie médiane : 15 mm Ø extrémités : 4 mm
	<b>Cathéter de Frydman</b> longueur utile 21,5 cm Ø externe 1,55 mm
	<b>E-Swab®</b>

Tableau 2 : Dispositifs testés pour réaliser des PEP.

### ***5. Déroulement d'un prélèvement endocervical :***

- Au bloc opératoire :

La patiente était en position gynécologique sous anesthésie générale. Nous avons réalisé une désinfection cervicale par deux badigeons à la polyvidone iodée. Nous avons ensuite testé trois méthodes.

- En consultation :

Les patientes étaient installées en position gynécologique et on mettait en place un spéculum. Dans un premier temps, on réalisait un PV comparatif dans le cul de sac vaginal postérieur. Après deux badigeons du col à la polyvidone iodée, on insérait une gaine protectrice à 2 cm dans l'endocol. On introduisait alors à l'intérieur de celle-ci un cathéter de Frydman relié à une seringue permettant d'aspirer la glaire. On retirait ensuite le cathéter - puis la gaine - afin que le cathéter reste protégé de l'exocol et du vagin.

### ***6. Analyses bactériologiques :***

Pour chaque prélèvement réalisé, les analyses suivantes ont été faites :

- Examen direct (semi-quantitatif : de "Absence" à "Très nombreux").
- Culture (semi-quantitatif de "Absence" à "Très nombreux").
- PCR quantitative ARN 16S (Ct)
- PCR quantitative Albumine (Ct)

La PCR quantitative permettait de comparer précisément le nombre de bactéries présentes dans le prélèvement (ARN 16S), ainsi que le nombre de cellules humaines présentes (Albumine). Le Ct (*Cycle Threshold* = cycle seuil) correspond au nombre de cycles à partir duquel la PCR se positive. Le Ct est donc utilisé pour quantifier l'ADN cible présent dans

l'échantillon. Plus le Ct est petit, plus le nombre de copies du gène amplifié est élevé dans le prélèvement de départ.

### 7. Résultats :

Les caractéristiques des patientes sont résumées dans le tableau 3.

	1	2	3	4
<b>Age</b>	22 ans	22 ans	39 ans	28 ans
<b>Gestité</b>	1	1	3	1
<b>Parité</b>	0	0	2	0
<b>ATCD IVG</b>	non	non	non	oui
<b>Autres ATCD*</b>	non	non	non	non
<b>Tabac</b>	oui	non	non	non
<b>ATB &lt; 15 jours</b>	non	non	non	non
<b>Diabète</b>	non	non	non	non
<b>TV &lt; 3 jours</b>	non	non	non	non
<i>Si non enceinte</i>				
<b>Cycle</b>				J21
<b>Contraception</b>				pilule
<i>Si enceinte</i>				
<b>Terme</b>	12+4 SA	5+6 SA	5 SA	
<i>Prélèvement</i>				
<b>Conditions</b>	au bloc, AG	consultation	consultation	consultation
<b>Matériel</b>	1) Endobrush 2) Aspiglaire 3) Cathéter de « Frydman » + seringue	Cathéter de « Frydman » + seringue + gaine (Endobrush®)	Cathéter de « Frydman » + seringue + gaine (Stérilet NT 380®) + curseur	Cathéter de « Frydman » + seringue + gaine (Endobrush®)

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des patientes.

\* Antécédents de fausse couche et d'accouchement prématuré. Antécédents infectieux gynécologiques/ IST.

Problèmes rencontrés lors des prélèvements :

**Patiente 1** (sous AG au bloc opératoire, IVG) :

- Endobrush® : Brosse trop longue qui « bute » sur l'orifice interne et reste extériorisée à l'orifice externe.
- Aspiglaire® : puissance d'aspiration limitée, volume prélevé très faible
- Cathéter de « Frydman » + seringue 10 ml : ce système parait être une bonne alternative : peu traumatique, prélèvement à un « étage » précis dans l'endocol, la seringue permet une bonne puissance d'aspiration.
- Endobrush® (essai numéro 2) : Si on force, il se produit un écoulement très hémorragique, avec probable rupture des membranes, nous n'avons pas réalisé d'analyse (figure 24).



*Figure 24: Prélèvement endocervical protégé : Endobrush® (essai numéro 2)*

***Patiente 2*** (consultation) :

Il s'agit d'une patiente nullipare, le col est fermé. La patiente est très gênée et ressent une forte douleur lorsqu'on introduit la gaine du cathéter de Frydman dans l'endocol. On récupère une quantité de prélèvement faible (non visible à l'œil nu dans le cathéter).

***Patientes 3 et 4*** (consultation)

Aucun problème n'est rencontré au niveau de la méthode (cathéter de Frydman), aucun effet indésirable n'est ressenti par les patientes. On récupère une bonne quantité de prélèvement pour la patiente 3 (visible à l'œil nu), plus faible pour la patiente 4 (non visible).

	<b>Aspiglaire®</b>	<b>Endobrush®</b>	<b>Cathéter de Frydman + gaine stérilet</b>
<b>Protection vis-à-vis du vagin</b>	non	oui	oui
<b>Capacité d'aspiration</b>	XX	X	XXX
<b>Quantité de prélèvement</b>	XX	XX	XXX
<b>Facilité de décharge du matériel</b>	XX	X	XXX
<b>Traumatisme cervical</b>	X	XXX	X
<b>Effets indésirables</b>			
<b>Reproductibilité globale du geste/précision</b>	XX	XX	XXX

*Tableau 4 : Tableau comparatif des différentes méthodes de prélèvement*

*Résultats bactériologiques*

**a) Prélèvements réalisés au bloc opératoire**

L'examen direct et la culture faisaient apparaître des résultats similaires pour les 3 méthodes de prélèvement évaluées (tableau 5). On ne mettait en évidence de différence entre les 3 prélèvements pour le nombre de bactéries ou de leucocytes présents.

<b>Patiente</b>	<b>Prélèvement</b>	<b>Examen Direct</b>	<b>Culture</b>	<b>Leucocytes</b>
<b>1</b>	Endobrush®	Absence de bactéries	Rares Lactobacilles	Absence
<b>1</b>	Aspiglaire®	Rares Lactobacilles	Rares Lactobacilles	Absence
<b>1</b>	Frydman	Absence de bactéries	Rares Lactobacilles	Absence

*Tableau 5 : Prélèvements au bloc opératoire (Patiente 1) : Examen Direct et Culture*

Il n'y avait pas de différence significative au niveau de la PCR Albumine entre les 3 prélèvements (tableau 6), ce qui était en faveur d'un volume d'échantillon similaire quel que soit la méthode de prélèvement.

<b>Patiente</b>	<b>Prélèvement</b>	<b>ARN 16S (Ct)</b>	<b>Albumine (Ct)</b>
<b>1</b>	Endobrush	30	25
<b>1</b>	Aspiglaire	29	25
<b>1</b>	Frydman	35	27

*Tableau 6 : Prélèvements au bloc opératoire (Patiente 1): PCR quantitative*

Par contre, la PCR ARN 16S retrouvait un nombre de bactéries plus faible pour le prélèvement réalisé avec le cathéter de Frydman que pour les deux autres méthodes, avec une différence de 5 à 6 Ct, ce qui correspond à  $2^5$  à  $2^6$  fois moins de bactéries (soit 32 à 64 fois moins de bactéries).

Le cathéter de Frydman permettait d'obtenir la charge bactérienne la plus faible, ce qui militait en faveur d'un caractère plus sélectif du prélèvement.

b) **Prélèvements réalisés en consultation :**

Les résultats des prélèvements des patientes 2, 3 et 4 sont répertoriés dans le tableau 7 :

<b>Patiente</b>	<b>Prélèvement</b>	<b>Examen Direct</b>	<b>Culture</b>	<b>Leucocytes</b>
<b>2</b>	Frydman	Absence de bactéries	Stérile	Absence
<b>2</b>	Prélèvement Vaginal	Très Nombreux lactobacilles	Très nombreux lactobacilles	Nombreux
<b>3</b>	Frydman	Absence de bactéries	Rares lactobacilles	Absence
<b>3</b>	Prélèvement Vaginal	Nombreux lactobacilles	Très nombreux lactobacilles	Nombreux
<b>4</b>	Frydman	Absence de bactéries	Stérile	Absence
<b>4</b>	Prélèvement Vaginal	Très Nombreux lactobacilles	Très nombreux lactobacilles	Nombreux

Tableau 7: prélèvements en consultation. Examen direct et culture

L'*examen direct et la culture* retrouvaient des résultats similaires pour ces 3 patientes (figure 25). Même s'il n'était pas possible de quantifier exactement les différences entre prélèvements, le nombre de bactéries retrouvé était beaucoup plus élevé pour les prélèvements vaginaux que pour les aspirations endocervicales protégées à l'aide du cathéter de Frydman.

On retrouvait en culture de rares lactobacilles pour le prélèvement protégé de la patiente 3, alors qu'il n'y en avait pas pour les patientes 2 et 4. Cela pourrait être dû à un volume d'échantillon plus important, mais on ne peut pas l'affirmer avec les données de l'examen direct et de la culture.

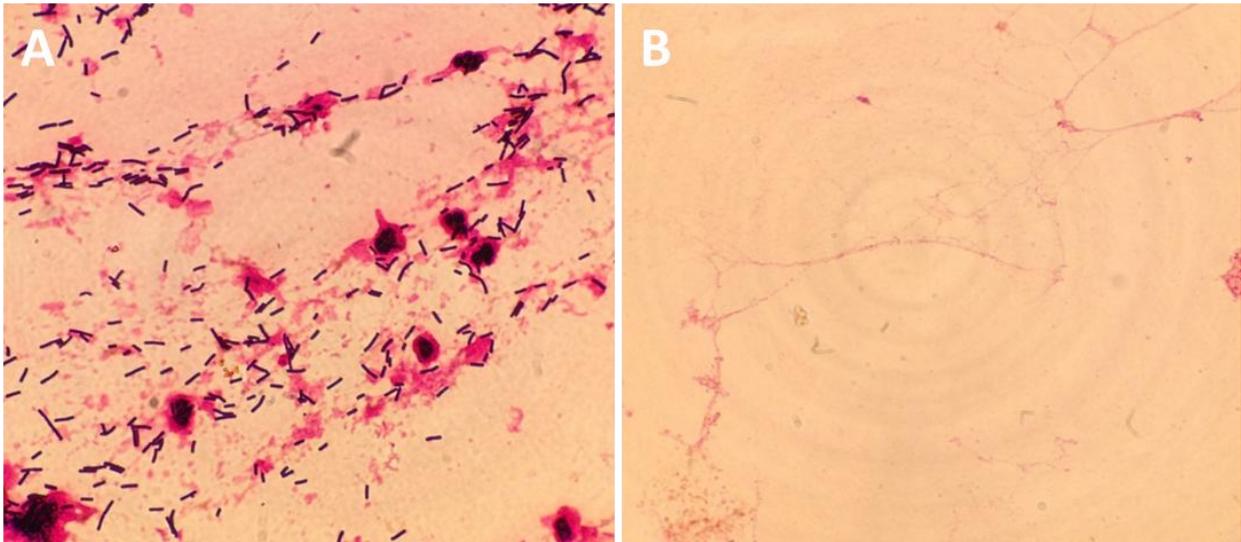


Figure 25 : Examen direct. Comparaison du PV et l'aspiration endocervicale protégée.

*A - prélèvement vaginal de la patiente 4. Très nombreux lactobacilles et nombreux leucocytes visibles à la coloration de Gram. / B - Aspiration protégée de la patiente 4. Absence de bactéries et de leucocytes visibles à la coloration de Gram.*

Le nombre de leucocytes était également plus élevé pour les prélèvements vaginaux que pour les prélèvements protégés. Cela peut être dû à un volume de prélèvement plus élevé lors de la réalisation du PV, ou bien simplement au fait qu'il y a moins de leucocytes présents au niveau de l'endocol.

Les prélèvements endocervicaux réalisés de manière protégée avec le cathéter de Frydman contenaient moins d'ADN bactérien (16 S) que les prélèvements vaginaux (tableau 8). En effet, il y avait  $2^{12}$  (soit 4000) fois moins d'ADN bactérien dans le prélèvement protégé que dans le prélèvement vaginal pour la patiente 2,  $2^5$  (soit 32) fois moins pour la patiente 3, et  $2^{13}$  (soit 8000) fois moins pour la patiente 4.

Patiente	Prélèvement	ARN 16S (Ct)	Albumine (Ct)
2	Frydman	36	34
2	Prélèvement Vaginal	24	22
3	Frydman	32	25
3	Prélèvement Vaginal	27	23
4	Frydman	38	30
4	Prélèvement Vaginal	25	24

Tableau 8: Prélèvements en consultation (patientes 2, 3, 4) : PCR quantitative ARN 16S

**L'albumine :** Pour affiner ces résultats, on peut également tenir compte de la quantité d'albumine présente dans le prélèvement qui est le reflet direct du volume de l'échantillon prélevé.

Pour la patiente 2, le Ct de la PCR Albumine était élevé ce qui correspond à un nombre de cellules humaines faible dans l'échantillon. Cela s'expliquait car le prélèvement avait été difficile à réaliser pour cette patiente nullipare. Il paraissait donc difficile d'interpréter les résultats de la PCR ARN 16S pour la patiente 2, car le volume de l'échantillon prélevé semblait insuffisant.

Pour la patiente 3, le Ct de la PCR Albumine était faible, ce qui correspondait à un nombre de cellules humaines élevé, et donc à un volume important de l'échantillon prélevé. C'était également l'impression de l'opérateur au moment de la réalisation du prélèvement. Il y avait

$2^7$  (soit 128) fois moins de copies d'ARN 16S que de copies d'albumine présentes dans l'échantillon.

Pour la patiente 4, le Ct de la PCR Albumine était intermédiaire, ce qui correspondait à un volume moyen d'échantillon prélevé. Il y avait  $2^8$  (soit 256) fois moins de copies d'ARN 16S que de copies d'albumine présentes dans l'échantillon.

Sur le plan microbiologique, les prélèvements protégés réalisés avec le cathéter de Frydman semblaient donc identiques entre eux mais différents des prélèvements vaginaux. Le nombre de bactéries par cellule humaine était 100 fois plus faible pour les prélèvements endocervicaux que pour les prélèvements vaginaux.

## **Discussion**

### 1) Sur la méthode de prélèvement :

D'abord, il s'agissait pour nous de trouver un matériel adapté aux dimensions de l'endocol, afin d'être le moins traumatique possible. La largeur du cathéter devait être inférieure au diamètre du canal endocervical. De plus, il s'agissait de prélever à la bonne hauteur dans le col, afin d'éviter une contamination vaginale, et sans atteindre la cavité afin de ne prendre aucun risque infectieux théorique ou de rupture des membranes.

La brosse (poil longs ou courts) a permis de récupérer une bonne quantité de matériel mais s'est révélée plus traumatique qu'un simple système aspiratif et a entraîné un saignement. Or la présence de sang peut être inhibitrice pour la réaction de PCR, et il était difficile de décharger la glaire dans l'E-swab à partir d'une brosse.

L'aspiglaire permettait théoriquement d'aspirer la glaire, très visqueuse en cours de grossesse, mais ne permettait pas de récupérer une quantité de matériel suffisante.

Le cathéter de Frydman, en permettant de connecter une seringue, a permis d'avoir une puissance d'aspiration plus importante. La quantité de glaire obtenue avec un cathéter de ce diamètre est restée faible (le plus souvent non visible à l'œil nu dans nos prélèvements), mais elle a permis de réaliser l'ensemble des examens souhaités sur chacun des 4 prélèvements (Patientes 1, 2, 3 et 4).

### 2) Sur les résultats bactériologiques obtenus :

D'abord toutes les tentatives de prélèvements ont été fructueuses : elles contenaient de la glaire, comme le prouvait indirectement la présence d'albumine ; et leur volume s'est révélé la plupart du temps suffisamment important pour réaliser les analyses que nous souhaitions. Il

paraît important de rapporter l'ARN 16S à l'albumine afin de s'affranchir du volume d'échantillon.

D'autre part, les prélèvements endocervicaux contenaient en moyenne 100 fois moins de bactéries par cellule humaine que dans le vagin, ce qui va dans le sens du rôle « barrière » du canal endocervical. L'examen direct de la glaire ne montrait pas ou peu de bactéries, et celles qui étaient rencontrées étaient saprophytes du vagin (Lactobacilles). De même, on ne retrouvait pas ou peu de leucocytes dans l'endocol. Nos résultats allaient dans le sens d'une glaire cervicale physiologiquement « stérile » ou tout du moins capable de limiter la prolifération bactérienne dans l'endocol.

### **Création d'un cathéter protégé de prélèvement avec le laboratoire CCD**

A la suite de cette étude contributive chez 4 patientes réalisant une IVG, nous avons cherché à créer le meilleur cathéter protégé possible pour répondre aux objectifs de qualité, de sensibilité et de spécificité des prélèvements endocervicaux.

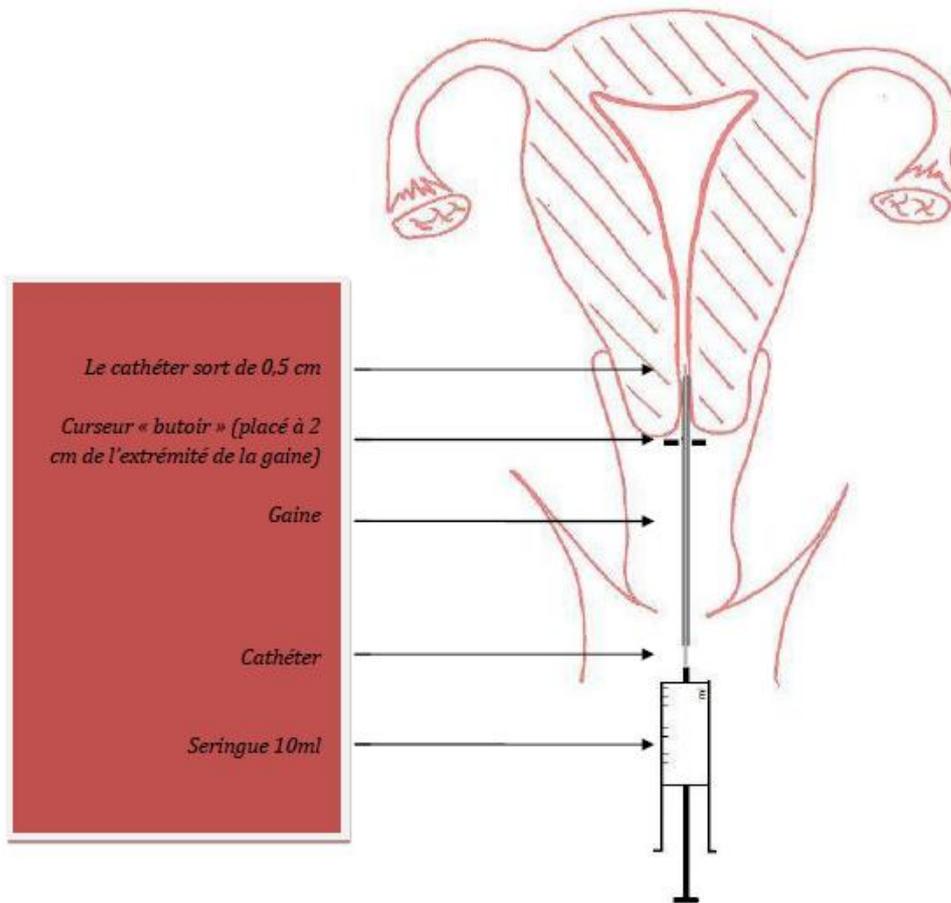
Pour nous affranchir de la flore du vagin, il fallait une gaine protectrice que l'on puisse insérer dans l'endocol. Pour être précis sur la hauteur de prélèvement dans l'endocol, un curseur présent sur la gaine protectrice nous a paru très utile, sous forme d'un butoir qui puisse rendre la hauteur de prélèvement moins aléatoire, à la fois reproductible et moins dangereuse.

Avec la collaboration du laboratoire CCD et à l'aide de dispositifs déjà existants pour d'autres produits de ce laboratoire, nous avons mis au point ce cathéter protégé de prélèvement endocervical (Figures 26 et 27). Il est composé par :

- Un cathéter interne de prélèvement qui correspond à l'inserteur du *cathéter de Frydman Soft Souple*® (diamètre 1,5 mm, longueur 18 cm, référence 1324201), utilisée pour le transfert d'embryon. L'extrémité proximale possède une embase permettant d'adapter une seringue. L'extrémité distale dépasse de 5 millimètres la gaine de protection.
- Une gaine de protection qui correspond à la *Spirette*®. Cette gaine est marquée tous les centimètres sur les 5 centimètres distaux. Son orifice distal est effilé afin d'être le moins traumatique possible.
- Un obturateur passant dans la *Spirette*®, permettant d'éviter le phénomène de carottage.
- Un cône « butoir » en silicone qui correspond au cône du *Siscone*®. Celui-ci est déplaçable sur la gaine de protection avec une résistance importante. On le placera de manière systématique à 2 cm de l'extrémité. On peut ainsi réaliser le prélèvement à la profondeur désirée avec une sécurité essentielle permettant de ne pas aller « trop loin » dans le col.



*Figure 26: Dispositif permettant de réaliser un prélèvement endocervical protégé. Laboratoire CCD*



*Figure 27 : Schéma représentant la technique sélectionnée : prélèvement protégé, peu traumatique, précis sur la hauteur et reproductible*

L'ensemble de ces observations sur l'environnement endocervical et les constatations que nous avons faites lors de cette étude exploratoire sur les dispositifs médicaux ont permis de définir les conditions d'un protocole destiné à préciser la composition de l'endocol chez la femme enceinte, en observant le contenu bactériologique et cytologique de ce dernier à partir des données provenant d'un prélèvement protégé réalisé à 25 mm de profondeur.

## Bibliographie

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet* 2008;371(9606):75–84.
2. Srinivasan U, Misra D, Marazita ML, Foxman B. Vaginal and oral microbes, host genotype and preterm birth. *Med Hypotheses* 2009;73(6):963–75.
3. Fortner KB, Grotegut CA, Ransom CE, Bentley RC, Feng L, Lan L, et al. Bacteria Localization and Chorion Thinning among Preterm Premature Rupture of Membranes. *PLoS ONE* 2014;9(1):e83338.
4. Romero R, Gómez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Cheol Kim J, Mee Kim Y. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001;15(s2):41–56.
5. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342(20):1500–7.
6. Petit E, Abergel A, Dedet B, Subtil D. [The role of infection in preterm birth]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 2012;41(1):14–25.
7. Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2006;113:17–42.
8. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2009;116(10):1315–24.
9. Sawada M, Otsuki K, Mitsukawa K, Yakuwa K, Nagatsuka M, Okai T. Cervical inflammatory cytokines and other markers in the cervical mucus of pregnant women with lower genital tract infection. *Int J Gynecol Obstet* 2006;92(2):117–21.
10. Becher N, Adams Waldorf K, Hein M, Uldbjerg N. The cervical mucus plug: structured review of the literature. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88(5):502–13.
11. Hansen LK, Becher N, Bastholm S, Glavind J, Ramsing M, Kim CJ, et al. The cervical mucus plug inhibits, but does not block, the passage of ascending bacteria from the vagina during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013;;n/a–n/a.
12. Kurita T. Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differ Res Biol Divers* 2011;82(3):117–26.
13. Sajjad Y. Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36(5):929–37.
14. Kamina P. Anatomie clinique de l'appareil génital féminin. EM-Consulte

15. Danforth DN. The morphology of the human cervix. *Clin Obstet Gynecol* 1983;26(1):7–13.
16. Health J. *Whaeter's Functional Histology*. 2e ed. de boeck; 2006.
17. Tranbaloc P. Histoire naturelle des lésions précurseurs du cancer du col utérin. *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2008;36(6):650–5.
18. Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol* 2002;57(1-2):217–24.
19. Myers KM, Paskaleva AP, House M, Socrate S. Mechanical and biochemical properties of human cervical tissue. *Acta Biomater* 2008;4(1):104–16.
20. Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38(2):267–79.
21. Eroschenko VP. *Atlas of histology with functional correlations*. 11th ed. wolters kluwer; 2008.
22. Myers K, Socrate S, Tzeranis D, House M. Changes in the biochemical constituents and morphologic appearance of the human cervical stroma during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144, Supplement 1:S82–S89.
23. Word R, Li X-H, Hnat M, Carrick K. Dynamics of Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition: Mechanisms and Current Concepts. *Semin Reprod Med* 2007;25(1):069–79.
24. Ludmir J, Sehdev HM. Anatomy and physiology of the uterine cervix. *Clin Obstet Gynecol* 2000;43(3):433–9.
25. Uldbjerg N, Ekman G, Malmström A, Olsson K, Ulmsten U. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147(6):662–6.
26. Obara M, Hirano H, Ogawa M, Tsubaki H, Hosoya N, Yoshida Y, et al. Changes in molecular weight of hyaluronan and hyaluronidase activity in uterine cervical mucus in cervical ripening. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80(6):492–6.
27. Gupta T, Verma NK, Sood A. Effects of intracervical injection of hyaluronidase in primigravidae during labour. *J Indian Med Assoc* 1994;92(2):47–8.
28. Leppert PC, Yu SY, Keller S, Cerreta J, Mandl I. Decreased elastic fibers and desmosine content in incompetent cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157(5):1134–9.
29. Takemura M, Itoh H, Sagawa N, Yura S, Korita D, Kakui K, et al. Cyclic mechanical stretch augments hyaluronan production in cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2005;11(9):659–65.
30. Timmons BC, Mitchell SM, Gilpin C, Mahendroo MS. Dynamic Changes in the Cervical Epithelial Tight Junction Complex and Differentiation Occur during Cervical Ripening and Parturition. *Endocrinology* 2007;148(3):1278–87.

31. Read CP, Word RA, Ruscheinsky MA, Timmons BC, Mahendroo MS. Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction* 2007;134(2):327–40.
32. Schmitz T, Levine BA, Nathanielsz PW. Localization and steroid regulation of prostaglandin E2 receptor protein expression in ovine cervix. *Reproduction* 2006;131(4):743–50.
33. Crane JMG, Hutchens D. Transvaginal sonographic measurement of cervical length to predict preterm birth in asymptomatic women at increased risk: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31(5):579–87.
34. Pires CR, Moron AF, Mattar R, Diniz ALD, Andrade SGA, Bussamra LCS. Cervical gland area as an ultrasonographic marker for preterm delivery. *Int J Gynecol Obstet* 2006;93(3):214–9.
35. Mills stacey E. *Histology for pathologists*. 3rd ed.
36. Bélec L. Defenses of the female genital tract against infection. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 2002;31(6 Suppl):4S45–44S59.
37. Nold C, Anton L, Brown A, Elovitz M. Inflammation promotes a cytokine response and disrupts the cervical epithelial barrier: a possible mechanism of premature cervical remodeling and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206(3):208.e1–208.e7.
38. Hein M, Valore EV, Helmig RB, Uldbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(1):137–44.
39. Hein M. An in vitro study of antibacterial properties of the cervical mucus plug in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185(3):586–92.
40. Brunelli R, Papi M, Arcovito G, Bompiani A, Castagnola M, Parasassi T, et al. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J* 2007;21(14):3872–6.
41. Mall AS. Analysis of mucins: role in laboratory diagnosis. *J Clin Pathol* 2008;61(9):1018–24.
42. Cole AM, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun* 1999;67(7):3267–75.
43. Chrétien FC. Cervical mucus. III. Physiological roles. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 1977;6(4):451–88.
44. Bigelow JL, Dunson DB, Stanford JB, Ecochard R, Gnoth C, Colombo B. Mucus observations in the fertile window: a better predictor of conception than timing of intercourse. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;19(4):889–92.
45. Critchfield AS, Yao G, Jaishankar A, Friedlander RS, Lieleg O, Doyle PS, et al. Cervical Mucus Properties Stratify Risk for Preterm Birth. *PLoS ONE [Internet]* 2013 [cited 2013 Dec 7];8(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731331/>

46. Jemelka BE, Parker DW, Mirkes R. NaProTECHNOLOGY and Conscientious OB/GYN Medicine. *Virtual Mentor* 2013;15(3):213.
47. Collier F, Letombe B. Contraception naturelle et chimique chez la femme. [Httpwwwem-Premiumcomdoc-Distantuniv-Lille2/fr/traitements/00-19906](http://www.em-premium.com/doc-Distantuniv-Lille2/fr/traitements/00-19906) [Internet] [cited 2014 Jan 4]; Available from: [http://www.em-premium.com.doc-distant.univ-lille2.fr/article/1931/resultatrecherche/6](http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/article/1931/resultatrecherche/6)
48. A prospective multicentre trial of the ovulation method of natural family planning. III. Characteristics of the menstrual cycle and of the fertile phase. *Fertil Steril* 1983;40(6):773–8.
49. Eggert-Kruse W, Botz I, Pohl S, Rohr G, Strowitzki T. Antimicrobial activity of human cervical mucus. *Hum Reprod* 2000;15(4):778–84.
50. Schmitz T, Maillard F, Bessard-Bacquaert S, Kayem G, Fulla Y, Cabrol D, et al. Selective use of fetal fibronectin detection after cervical length measurement to predict spontaneous preterm delivery in women with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(1):138–43.
51. Rizzo G, Capponi A, Arduini D, Lorido C, Romanini C. The value of fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions and of ultrasonographic examination of the uterine cervix in predicting premature delivery for patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(5):1146–51.
52. Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, Casal D, Shah KD, Thung SN, et al. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med* 1991;325(10):669–74.
53. Wenstrom KD, Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, DuBard MB, Cliver SP. Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178(3):546–50.
54. Harirah H, Donia SE, Hsu C-D. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):80–4.
55. Holst R-M, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm U-B, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84(6):551–7.
56. Lange M, Chen FK, Wessel J, Buscher U, Dudenhausen JW. Elevation of interleukin-6 levels in cervical secretions as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82(4):326–9.
57. Jacobsson B, Holst R-M, Mattsby-Baltzer I, Nikolaitchouk N, Wennerholm U-B, Hagberg H. Interleukin-18 in cervical mucus and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation and preterm delivery. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2003;110(6):598–603.

58. Gonzalez JM, Dong Z, Romero R, Girardi G. Cervical Remodeling/Ripening at Term and Preterm Delivery: The Same Mechanism Initiated by Different Mediators and Different Effector Cells. *PLoS ONE* 2011;6(11):e26877.
59. Goldenberg RL, Goepfert AR, Ramsey PS. Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192(5 Suppl):S36–46.
60. Becher N, Waldorf KA, Hein M, Uldbjerg N. The cervical mucus plug: Structured review of the literature. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88(5):502–13.
61. Shah SJ, Yu KH, Sangar V, Parry SI, Blair IA. Identification and Quantification of Preterm Birth Biomarkers in Human Cervicovaginal Fluid by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J Proteome Res* 2009;8(5):2407–17.
62. SLOTNICK IJ, HILDEBRANDT RJ, PRYSTOWSKY H. Microbiology of the femal genital tract. IV. Cervical and vaginal flora during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1963;21:312–7.
63. Svare JA, Andersen LF, Langhoff-Roos J, Jensen ET, Bruun B, Lind I, et al. The relationship between prior cervical conization, cervical microbial colonization and preterm premature rupture of the membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;47(1):41–5.
64. Harrison HR, Alexander ER, Weinstein L, Lewis M, Nash M, Sim DA. Cervical Chlamydia trachomatis and mycoplasmal infections in pregnancy. *Epidemiology and outcomes. JAMA J Am Med Assoc* 1983;250(13):1721–7.
65. Lamont RF, Newman MJ, Dunlop PD, Elder MG. The use of high vaginal, endocervical and rectal swabs in the diagnosis of genital infection in association with pre-term labour. *Br J Clin Pract* 1988;42(4):146–9.
66. Association of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis with intrauterine growth retardation and preterm delivery. The John Hopkins Study of Cervicitis and Adverse Pregnancy Outcome. *Am J Epidemiol* 1989;129(6):1247–57.
67. Horowitz S, Horowitz J, Mazor M, Porath A, Glezerman M. Ureaplasma urealyticum cervical colonization as a marker for pregnancy complications. *Int J Gynecol Obstet* 1995;48(1):15–9.
68. Aaltone R, Jalava J, Laurikainen E, Kärkkäinen U, Alanen A. Cervical ureaplasma urealyticum colonization: comparison of PCR and culture for its detection and association with preterm birth. *Scand J Infect Dis* 2002;34(1):35–40.
69. Silva MG, Pera\ccoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Pera\ccoli MTS. Cervical< i> Lactobacillus</i> and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003;81(2):175–82.
70. Gonz&acute;lez Bosquet E, Gen&eacute; A, Ferrer I, Borr&acute;s M, Laila JM. Value of Endocervical &lt;i>&lt;/i>Ureaplasma &lt;i>&lt;/i>Species Colonization as a Marker of Preterm Delivery. *Gynecol Obstet Invest* 2006;61(3):119–23.

71. Medina M, Moya W, Hidalgo L, Calle A, Terán E, Chedraui P. Molecular identification of endocervical *Chlamydia trachomatis* infection among gestations at risk for preterm birth in Ecuador. *Arch Gynecol Obstet* 2009;279(1):9–10.
72. Ramos BR, Poletini J, Marcolino LD, Vieira EP, Marques MA, Tristão AR, et al. Prevalence and risk factors of *Chlamydia trachomatis* cervicitis in pregnant women at the genital tract infection in obstetrics unit care at Botucatu Medical School, São Paulo State University-UNESP, Brazil. *J Low Genit Tract Dis* 2011;15(1):20–4.
73. Fanrong K, James G, Zhenfang M, Gordon S, Wang B, Gilbert GL. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* – support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 1999;49(4):1879–89.
74. Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, et al. Association between Preterm Birth and Vaginal Colonization by *Mycoplasmas* in Early Pregnancy. *J Clin Microbiol* 2006;44(1):51–5.
75. Kasper DC, Mechtler TP, Reischer GH, Witt A, Langgartner M, Pollak A, et al. The bacterial load of *Ureaplasma parvum* in amniotic fluid is correlated with an increased intrauterine inflammatory response. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67(2):117–21.
76. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. *Obstet Gynecol* 2001;97(2):211–9.
77. Subtil D. [Prognostic and therapeutic value of biologic signs of infection in the management of preterm labor (amniocentesis excepted)]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 2002;31(7 Suppl):5S43–51.
78. Ovalle A, Romero R, Gómez R, Angélica Martínez M, Nien JK, Ferrand P, et al. Antibiotic administration to patients with preterm labor and intact membranes: Is there a beneficial effect in patients with endocervical inflammation? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19(8):453–64.

## **Annexes : Proposition d'un protocole de prélèvement d'endocol protégé chez la femme enceinte au premier trimestre**

### **ANNEXE 1 : Plan d'étude**

*NB : Ce protocole nécessitant l'utilisation d'un nouveau dispositif médical, l'accord d'un CCP sera obligatoire.*

#### **1. Rationnel de l'étude :**

Dans les accouchements très prématurés, une origine infectieuse est retrouvée dans 25 à 40% des cas <sup>[1,2]</sup>. La recherche d'un risque d'accouchement prématuré augmenté pourrait passer par la recherche d'une présence anormale de microorganismes dans le canal cervical.

Les études bactériologiques du canal endocervical sont peu nombreuses et anciennes. Elles sont difficiles à interpréter car la description du mode de prélèvement endocervical est peu précise, ne permettant pas d'éliminer une contamination par la flore vaginale. De plus l'existence de milieux de culture limités ne permettait pas de détecter la présence de certains micro-organismes. Enfin, le matériel de prélèvement lui-même était souvent un simple écouvillon.

La relation entre infection ovulaire ascendante et prématurité est clairement établie <sup>[1,5]</sup>. Il existe un lien statistique fort mais pas suffisant pour établir une causalité directe <sup>[1,6]</sup>. La Flore vaginale a été largement étudiée mais il existe peu d'information sur la flore endocervicale.

Les résultats de l'étude PREMEVA montrent que le vagin est probablement encore trop « loin » de l'œuf (données non publiées).

Ceci est confirmé par la méta-analyse de Brocklehurst et al., cette revue fournit peu de preuve

en faveur de la recherche et du traitement de la vaginose bactérienne chez la femme enceinte pour prévenir la prématurité <sup>[74]</sup>.

Dans l'étude récente de Hansen et al., des prélèvements d'endocol dits « étagés », à une profondeur définie, à visée bactériologique sont réalisés chez la femme enceinte selon un protocole de prélèvement précis. Cette étude prospective chez 21 femmes enceintes au premier et troisième trimestre. Un prélèvement vaginal, ainsi qu'un prélèvement endocervical distal et proximal sont réalisés. La charge bactérienne (ARN16S) est plus importante de manière significative dans le vagin que dans la partie distale que dans la partie proximale du bouchon muqueux <sup>[11]</sup>.

L'objet de cette étude est d'approfondir les connaissances bactériologiques sur l'environnement endocervical pendant la grossesse. Nous voudrions à plus long terme faire des prélèvements endocervicaux chez les patientes enceintes à risque de prématurité au premier trimestre de la grossesse, en les comparant à des patientes enceintes sans antécédents.

## ***2. Objectifs de l'étude***

### ***Principal :***

Décrire le contenu bactériologique et cytologique du canal endocervical prélevé de manière protégée à 2,5 cm de l'orifice externe chez des patientes enceintes au 1<sup>e</sup> trimestre de la grossesse. Comparer ce contenu à celui de femmes non enceintes en âge de procréer.

### ***Bénéfices attendus***

Description de la flore bactérienne endocervicale rencontrée chez la femme enceinte au premier trimestre de la grossesse. Description de son contenu cytologique.

### *3. Conception de la recherche*

#### Plan expérimental :

Etude descriptive prospective comparative unicentrique. Il s'agira d'une étude hospitalière dans laquelle on étudiera le contenu bactériologique de l'endocol au premier trimestre de la grossesse dans une population de patientes ayant recours à une Interruption Volontaire de Grossesse (IVG) chirurgicale soit entre 9 et 13+6 SA. Un prélèvement d'endocol protégé (PEP) sera réalisé au bloc opératoire avant le geste à 2,5 cm de profondeur dans l'endocol, ainsi qu'un prélèvement vaginal comparatif. Une population « contrôle » de patientes non enceintes bénéficiera des mêmes prélèvements avec la même technique.

#### Population :

*GROUPE 1* : Patientes enceintes au 1er trimestre ayant recours à une IVG chirurgicale (entre 9 et 13+6 SA)

*GROUPE 2* : Patientes non enceintes = population « contrôle »

#### Critères d'inclusion:

*GROUPE 1* : Patiente enceinte désirant avoir recours à une IVG. Technique chirurgicale, soit entre 9 et 13+6 SA.

- Respect de la procédure « pré-IVG »
- Respect des délais légaux avant une IVG

*GROUPE 2* : patiente non enceinte, « contrôle »

- Patiente majeure
- Contraception ou non ?
- En âge de procréer (18-45 ans)
- Première partie de cycle (pas de grossesse), lors de la mise en place d'un stérilet.

- Pas de contexte de MST ou Antibiothérapie récente (< 15 jours)

Intérêt de cette population : permet une information fiable sur l'état du canal endocervical (avant travail) sans prendre de risque pour la mère et le fœtus en l'absence de connaissances approfondies sur l'innocuité de ce prélèvement.

Limites : pas ou peu de connaissances sur les répercussions potentielles sur l'issue de la grossesse de ce type de prélèvement.

Critères d'exclusion :

*GROUPE 1 :*

- Refus de la patiente
- Patiente mineure
- Toucher Vaginal inférieur 3 jours
- Streptocoque B positif dans le vagin ou les urines ?
- Antibiothérapie pendant la grossesse
- Diabète de type 1 ou 2

*GROUPE 2 :*

- Refus de la patiente
- Patiente mineure
- Toucher Vaginal < 3 jours
- Antécédents d'IST récente inférieure à 15 jours
- Antibiothérapie récente inférieure à 15 jours

Critère principal, permettant de répondre à l'objectif principal :

Dans le PEP :

- **Charge bactérienne** dans l'endocol évaluée par ARN 16S (amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragment d'ARN et d'ADN ribosomique 16 S. Ces éléments codent pour l'une des deux sous-unités du ribosome, composant spécifique d'une espèce bactérienne. (Augmentation exponentielle du nombre copies du gène)
- Examen direct : présence de lactobacilles, ou autres bactéries, leucocytes
- Culture standard

Dans le PV comparatif : examen direct, cytologie, charge bactérienne ARN 16S, albumine (PCR)

Critères d'efficacité/sécurité :

- PCR quantitative albumine : présente dans les cellules eucaryotes, la présence d'albumine dans le prélèvement valide

Calcul du nombre de sujet de l'étude :

	<b>IVG chirurgicale</b>	<b>Patiente non enceinte en 1<sup>ère</sup> partie de cycle</b>
<b>PEP à 2,5 cm</b>	30	30
<b>PV comparatif</b>	30	30

Méthode et stratégie d'analyse :

Etude observationnelle descriptive

#### *4. Logistique de l'étude*

##### *Equipes participantes et lieu de réalisation de la recherche :*

Investigateur et Coordination :

Unité de Recherche Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, 59037 Lille.

Inclusion des témoins :

Service de Consultation en gynécologie , Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, 59037 Lille.

Service d'Orthogénie et Médecine du Couple, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, 59037 Lille.

*Réception et Logistique des prélèvements :*

Centre de Ressources Biologiques, Hôpital Cardiologique, CHRU Lille, 59037 Lille.

*Analyses biologiques :*

Centre de Biologie-Pathologie, CHRU de Lille 59037 Lille Cedex

*Inclusion des patientes :*

Les patientes recevront une information claire et adaptée lors de leur consultation « pré-IVG ». Une feuille d'information leur sera remise ainsi qu'une feuille de consentement qu'elles pourront signer si elles acceptent, soit lors de cette consultation, soit le jour de l'IVG à l'infirmière d'accueil (dossier médical).

Les patientes « témoins » non enceintes recevront une information claire et adaptée en consultation de gynécologie, ainsi qu'un consentement à signer. Après le prélèvement, il leur sera demandé de répondre à un rapide questionnaire de « vécu » du prélèvement.

Feuille d'information patiente : (annexe 2)

Consentement éclairé (annexe 3)

Feuille de recueil des caractéristiques des patientes (annexe 4)

*Déroulement d'un prélèvement :*

*Lieu :*

*GROUPE 1* : le jour de l'IVG chirurgicale, au bloc, avant la réalisation du geste si il s'agit d'une anesthésie locale avec bloc cervical, et après, si c'est une anesthésie générale.

*GROUPE 2* : patiente non enceinte vue en consultation de routine au CHRU de Lille pour la mise en place d'un stérilet.

*Description du geste :*

La patiente est installée en position gynécologique. Après la mise en place d'un speculum, on réalise un prélèvement vaginal standard au niveau du cul de sac vaginal postérieur. On désinfecte ensuite le col selon le protocole suivant :

- Tamponnement avec une compresse imbibée de Dakin/ polyvidone iodée
- Rinçage avec une compresse imbibée de sérum physiologique

*Infections cervicaux-vaginales et grossesse*

*Recommandations pour la bonne pratique clinique CNGOF 1997*

*Protocole Jeanne de Flandres*

On effectue alors le prélèvement d'endocol protégé à 2,5 cm :

- Introduction de la gaine contenant le cathéter dans l'orifice externe jusqu'au curseur, soit 2 cm dans l'endocol.

- On peut utiliser de manière facultative le mandrin pour faciliter l'introduction du cathéter dans l'endocol.
- Pas de mise en place de pinces de Pozzi préalable.
- Extériorisation du cathéter dans l'endocol qui dépasse la gaine de 0,5 cm
- Aspiration de la glaire à l'aide d'une seringue de 10 ml.
- Intériorisation du cathéter dans la gaine, protégeant ainsi le prélèvement.
- Retrait de l'ensemble.
- On décharge ensuite le prélèvement dans un tube E-swab.

## **5. Biologie**

*Lieu et identification des responsables :*

Centre de Biologie-Pathologie (CBP), CHRU de Lille 50037 Lille Cedex

*Nature des prélèvements :*

1 prélèvement vaginal et 1 prélèvement endocervical réalisés selon la technique décrite ci-dessus

*Partie pré-analytique :*

Le PV et le PEP sont transférés dans un milieu E-swab, puis envoyés au service de biologie moléculaire du laboratoire de microbiologie du CBP.

Conservation à +4°C avant extraction.

Extraction de l'ADN de 100µL de prélèvement de manière automatisée par MagNaPure réalisée 2x / semaine.

*Conservation des échantillons :* à -80°C, conservation des extraits d'ADN à -20°C.

*Analyse :*

Pour chaque prélèvement (PV et PEP), les analyses suivantes sont réalisées :

- Examen direct à la coloration de GRAM (semi-quantitatif : de "Absence" à "Très nombreux").
- Culture sur gélose chocolat (PVX) incubées à 35° sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures (semi-quantitatif de "Absence" à "Très nombreux")
- PCR quantitative ARN 16S (Ct=Cycle Threshold = cycle seuil))
- PCR quantitative Albumine (Ct)

Réalisation des PCR quantitatives sur Applied 7500.

La PCR quantitative permet de comparer précisément le nombre de bactéries présentes dans le prélèvement (ARN 16S), ainsi que le nombre de cellules humaines présentes (Albumine). Le Ct (*Cycle Threshold* = cycle seuil) correspond au nombre de cycles à partir duquel la PCR se positive. Le Ct est donc utilisé pour quantifier l'ADN cible présent dans l'échantillon. Plus le Ct est petit, plus le nombre de copies du gène amplifié est élevé dans le prélèvement de départ.

*Contrôles de qualité :*

Pour chaque prélèvement : contrôle d'absence d'inhibition et contrôle d'extraction (albumine : 2 copies du gène Albumine par cellule humaine), par « run » de PCR : un contrôle positif et un contrôle négatif.

## ***6. Evénements indésirables***

Certains effets secondaires théoriques pourront être rencontrés compte tenu du caractère « invasif » du geste, surtout dans le groupe 2 (par ordre de fréquence) :

- Douleur ou sensibilité pelvienne
- Saignement
- Risque infectieux
- Risque de perforation

## ***7. Financement***

Coût du matériel :

- Dispositif de PEP : en cours de discussion avec le laboratoire CCD
- 1 seringue de 10ml : 0,10 euros
- 2 E-swab par procédure : 2 x 0,66 euros

Coût des réactifs : 10,3 euros par prélèvement

- Extraction de l'ADN : 5 euros
- PCR : 2,65 euros

Soit un coût total d'environ 10 euros par prélèvement (9,07 €)

## ANNEXE 2 : Lettre d'information patiente

### « Etude ..... »

Mademoiselle, Madame,

Nous vous proposons de participer à une étude dans le cadre de la recherche biomédicale.

Il s'agit d'une étude « exploratoire » faisant suite à l'étude « PREMEVA » (essai randomisé multicentrique pour la prévention de l'accouchement PREmaturé par la recherche et le traitement de la VAginose bactérienne au premier trimestre la grossesse) réalisée ces dernières années dans le Nord –Pas de Calais.

Le but de notre étude est de comprendre les mécanismes mis en jeu lors des accouchements prématurés d'origine infectieuse. Pour cela nous avons besoin d'étudier la flore bactérienne située à l'intérieur du col de l'utérus.

Nous souhaitons réaliser un prélèvement vaginal et un prélèvement endo-cervical « protégé » (de la flore vaginale) (cf schéma explicatif).

Ces prélèvements sont habituels en gynécologie dans d'autres indications, notamment infectieuses.

Le matériel que nous utilisons est similaire à celui que vous avez pu parfois observer en consultation.

Les effets indésirables sont rares. Ils sont marqués par une sensibilité lors du prélèvement ; un léger saignement peut survenir à la suite de celui-ci (comme lors de la réalisation d'un frottis cervico-vaginal).

Groupe 1 : Ces prélèvements seront réalisés au bloc opératoire le jour de votre IVG, avant la réalisation du geste, après avoir donné votre consentement écrit.

Groupe 2 : Ces prélèvements seront réalisés en consultation lors de votre examen gynécologique, après avoir donné votre consentement écrit.

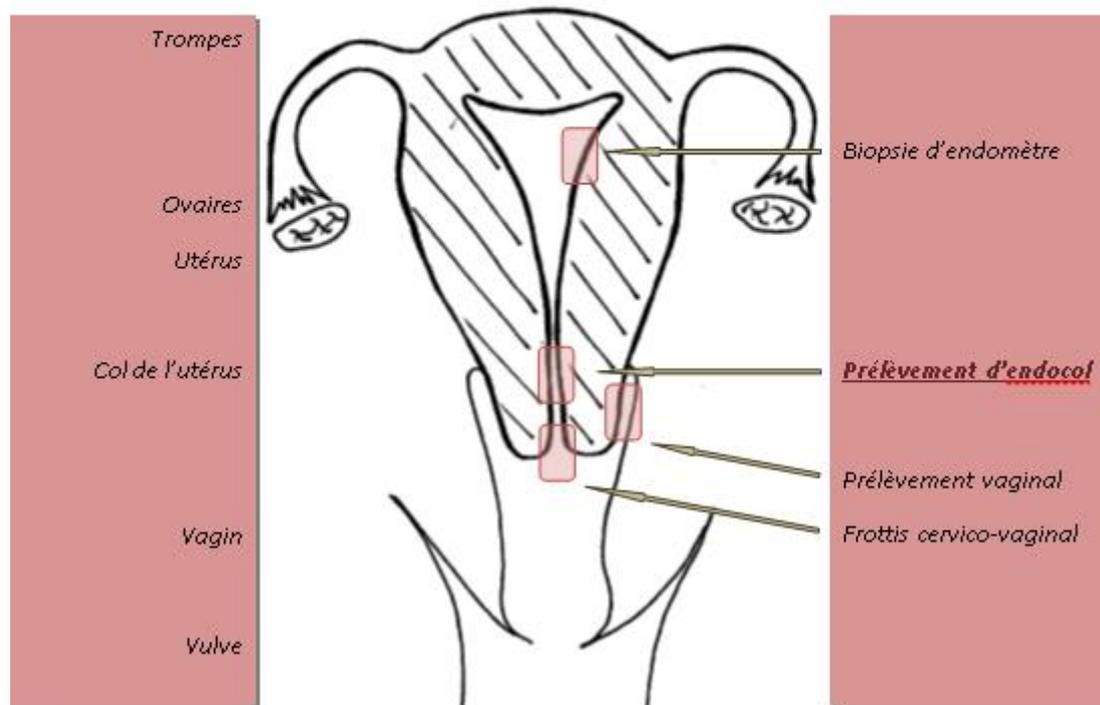
Cette étude a reçu un avis favorable de la Commission Consultative de Protection des Personnes se prêtant à la recherche Biomédicale.

Si vous le souhaitez, vous pourrez être informée des résultats.

Les résultats de ces prélèvements étant interprétés à titre exploratoire, ils ne conduiront pas à un traitement.

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Nous restons à votre disposition pour toute question complémentaire.

## Prélèvements habituels en consultation de gynécologie



Fait à :

le :

La Patiente :

Le Médecin :

## **ANNEXE 3 : Lettre d'information pour la participation à une recherche biomédicale**

### **Bactériologie endo-cervicale et prématurité**

---

Madame,

Nous vous proposons de participer à une étude de recherche clinique.

Cette lettre d'information vous détaille en quoi consiste cette étude.

Vous pourrez prendre le temps pour lire et comprendre ces informations afin de réfléchir à votre participation, et pour demander au médecin responsable de l'étude de vous expliquer ce que vous n'aurez pas compris.

**BUT DE L'ETUDE :** Explorer l'environnement endocervical, comme élément clé dans la recherche du mécanisme conduisant à des accouchements prématurés d'origine infectieuse.

**BENEFICE(S) ATTENDUS :** Connaissance du contenu bactériologique du canal endocervical

**DEROULEMENT DE L'ETUDE :**

**Groupe 1 :** Au bloc opératoire, le jour de l'IVG, avant la réalisation du geste, on réalise un prélèvement vaginal et 1 prélèvement d'endocol par aspiration de la glaire cervicale.

**Groupe 2 :** En consultation, lors de l'examen gynécologique classique pour la mise en place d'un stérilet. Mise en place d'un spéculum : 1 prélèvement vaginal puis après désinfection du col, 1 prélèvement d'endocol par aspiration de la glaire cervicale à l'aide d'un cathéter.

**Durée :** 3 min

**RISQUES POTENTIELS :** Ils sont peu fréquents et peu dangereux. Il s'agit principalement d'une douleur ou d'une sensibilité pelvienne lors du prélèvement, qui peu s'accompagner d'un saignement de faible abondance.

**FRAIS MEDICAUX :** Votre collaboration à ce protocole de recherche biomédicale n'entraînera pas de participation financière de votre part. Conformément à la loi, tous les frais liés à l'étude seront pris en charge par le promoteur de l'étude.

**LEGISLATION - CONFIDENTIALITE :** Conformément aux articles L. 1121-1 et suivants du Code de la Santé Publique, le Comité de Protection des Personnes a étudié ce projet de recherche et a émis un avis favorable à sa réalisation le xx/xx/xxxx

Un contrat d'assurance « *numéro de police : xxxxx* » a été souscrit par le promoteur de l'essai, « *nom du promoteur, adresse du promoteur* » auprès de la compagnie : « *nom de la compagnie, adresse de la compagnie* » pour couvrir les risques liés à cette recherche.

Toute information vous concernant recueillie pendant cet essai sera traitée de façon confidentielle.

Seuls les responsables de l'étude et éventuellement les autorités de Santé pourront avoir accès à ces données. A l'exception de ces personnes -qui traiteront les informations dans le plus strict respect du secret médical-, votre anonymat sera préservé. La publication des résultats de l'étude ne comportera aucun résultat individuel.

Si traitement informatisé des données :

Les données enregistrées à l'occasion de cette étude feront l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur. S'agissant de données nominatives, vous bénéficiez à tout moment, du droit d'accès et de rectification des données vous concernant auprès des responsables de l'étude et , en ce qui concerne les informations de nature médicale, ce droit est exercé par l'intermédiaire du Docteur .....conformément à la loi 78-17 du 06 janvier 1978 relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, modifiée par la loi n°94-548 du 1er juillet 1994, relative au traitement des données nominatives ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé. Le projet a reçu un avis favorable de la CNIL en date du .....

Conformément à l'article L 1122-1 du Code de la Santé Publique (loi de Mars 2002 relative aux droits des malades les résultats globaux de l'étude pourront vous être communiqués si vous le souhaitez.

Si vous avez des questions pendant votre participation à cette étude, vous pourrez contacter le médecin responsable de l'étude, le Dr ....., tél : .....

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui vous seront prodigués.

Vous pouvez également décider en cours d'étude d'arrêter votre participation sans avoir à vous justifier

Nous vous remercions d'avoir pris le temps de lire cette lettre d'information. Si vous êtes d'accord pour participer à cette recherche, nous vous invitons à signer le formulaire de consentement ci-joint.

**ANNEXE 4 : Formulaire de consentement pour la participation à une recherche biomédicale**

**Bactériologie endo-cervicale et prématurité**

---

Je soussigné(e) ..... (*nom et prénom du sujet*),

accepte de participer à l'étude ...**Titre** ...

Les objectifs et modalités de l'étude m'ont été clairement expliqués par le Dr.....

J'ai lu et compris la fiche d'information qui m'a été remise.

J'accepte que les documents de mon dossier médical qui se rapportent à l'étude puissent être accessibles aux responsables de l'étude et éventuellement aux autorités de santé. A l'exception de ces personnes, qui traiteront les informations dans le plus strict respect du secret médical, mon anonymat sera préservé.

J'accepte que les données nominatives me concernant recueillies à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement automatisé par les organisateurs de la recherche. Je pourrai exercer mon droit d'accès et de rectification auprès du Dr :.....

J'ai bien compris que ma participation à l'étude est volontaire.

Je suis libre d'accepter ou de refuser de participer, et je suis libre d'arrêter à tout moment ma participation en cours d'étude. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui me seront prodigués.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de cette étude de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Après en avoir discuté et avoir obtenu la réponse à toutes mes questions, j'accepte librement et volontairement de participer à la recherche qui m'est proposée.

Fait à .....,

Le .....

*Nom et signature de l'investigateur*

*Signature de la patiente*

## ANNEXE 5 : Feuille de recueil patiente

Nom

Prénom

Date de naissance

### Critères d'inclusion (cocher les cases) :

Patiente majeure

Patiente comprenant le français

- Si patiente « témoin » (non enceinte) :

- Pas d'antibiothérapie par voie générale < 15 jours
- Première partie de cycle (non enceinte)
- Pas de diabète
- Pas d'IST

- Si patiente « IVG » :

- IVG chirurgicale
- Procédure standard « JDF » respectée
- Délai de réflexion d' 1 semaine

Information faite

Feuille de consentement signée

## Antécédents

Age : |\_|

Nombre de grossesses antérieures : |\_|

Nombre de fausses couches : avant 13+6 SA |\_| entre 13 et 22 SA |\_|

Nombre d'IVG : |\_|

Nombre d'accouchement > 24 SA : |\_|

Nombre d'accouchements entre 24 et 37 SA : |\_|

Tabac : nb de cigarettes /jour : |\_| durée : |\_|

Antécédents infectieux gynécologiques : oui non si oui : germe ? vaginose ?

Antibiothérapie récente (< 15 jours): oui non, si oui laquelle :

- Si pas de grossesse :

Contraception : oui non, si oui laquelle :

DDR : |\_|\_|\_|\_| Jour du cycle |**J**|\_|\_|\_|

- Si Grossesse actuelle : IVG

Grossesse unique ou multiple

DDG : |\_|\_|\_|\_| Age gestationnel : |\_|\_|\_| + |\_| SA

Pathologie depuis le début de la grossesse :

### Effets indésirables éventuels

Aucun |\_|

Gène |\_|

Douleur |\_| (EVA= )

Saignement |\_|

**AUTEUR :** Bauwens

Justine

**Date de Soutenance :** 28 avril 2014

**Titre de la Thèse :** Environnement et contenu bactériologique du canal endocervical pendant la grossesse. Elaboration d'un protocole de prélèvement endocervical protégé.

**Thèse - Médecine - Lille 2014**

**Cadre de classement :** Thèse d'exercice

**DES + spécialité :** gynécologie -obstétrique

**Mots-clés :** prématurité – canal endocervical – bouchon muqueux- bactériologie- protocole

**Résumé :** Environnement et contenu bactériologique du canal endocervical pendant la grossesse. Elaboration d'un protocole de prélèvement endocervical protégé.

La prématurité concerne 5 à 9 % des naissances. Elle est responsable d'une morbi-mortalité significative en période périnatale et à long terme. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'attribuer une origine infectieuse à 25-40 % des accouchements prématurés. Il existe un lien statistique fort entre infection ovulaire ascendante et prématurité, mais celui-ci est insuffisant pour établir une causalité directe.

La flore vaginale a fait l'objet de nombreuses études, alors que l'environnement endocervical reste mal connu.

L'objet de cette thèse est faire le point sur les connaissances permettant de faire le lien entre l'environnement endocervical et la prématurité.

Le col utérin, capable de modifier de manière importante ses propriétés structurelles et architecturales, est un organe essentiel au déroulement physiologique de la grossesse et de l'accouchement.

Le canal endocervical est tapissé par un épithélium mucosécrétant. Son intégrité joue un rôle de barrière mécanique, premier mur de défense contre les agents pathogènes, en particulier lorsque le col est vulnérable en péri-partum.

La glaire cervicale, dont la composition varie au cours du cycle menstruel, est sécrétée par l'épithélium endocervical en fonction de son imprégnation hormonale. Elle a un rôle primordial, mécanique et immunologique. Composée principalement de mucine, elle s'épaissit pendant la grossesse pour former le bouchon muqueux.

Les études portant sur la microbiologie du canal endocervical sont peu nombreuses. L'absence de précision sur la technique de prélèvement peut remettre en cause leur fiabilité car il existe un risque important de contamination par la flore vaginale.

Nous avons réalisé une recherche exploratoire chez des patientes réalisant une interruption volontaire de grossesse afin de déterminer le matériel le plus adapté pour la réalisation d'un prélèvement endocervical protégé à visée bactériologique, acceptable au premier trimestre de la grossesse. Les prélèvements endocervicaux contenaient en moyenne cent fois moins de bactéries par cellule humaine que dans le vagin. Nous avons créé un nouveau dispositif médical permettant de réaliser des prélèvements endocervicaux protégés.

Ces données ont permis de définir les conditions d'un protocole destiné à préciser la composition de l'endocol chez la femme enceinte, en observant le contenu bactériologique et cytologique de ce dernier à partir des données provenant d'un prélèvement protégé réalisé à 25 mm de profondeur.

**Composition du Jury :**

**Président :**

Madame le Professeur Véronique Houfflin-Debarge

**Asseseurs :**

Monsieur le Professeur Damien Subtil

Madame le Professeur Karine Faure

Monsieur le Docteur Rodrigue Dessein