# MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu publiquement le 17 Septembre 2019 Par Aurore LOQUET

Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de

#### THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

\_\_\_\_\_

# LA PREMATURITE EST-ELLE LIEE A DES ANOMALIES DE LA FLORE VAGINALE ? L'ETUDE PREMEVA2

\_\_\_\_\_

#### Membres du jury:

Président : Professeur Delphine ALLORGE,

Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille,

Praticien Hospitalier, CHU, Lille

Assesseurs: Professeur Damien SUBTIL,

Professeur des Universités, Faculté de Médecine, Lille,

Praticien Hospitalier, CHU, Lille

**Docteur Etienne BROCHOT,** 

Maître de conférences des Universités, Faculté de Pharmacie, Amiens, Praticien Hospitalier, CHU, Amiens

**Docteur Rodrigue DESSEIN,** 

Maître de conférences des Universités, Faculté de Médecine, Lille, Praticien Hospitalier, CHU, Lille

**Docteur Anne GOFFARD,** 

Maître de conférences des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, Praticien Hospitalier, CHU, Lille

**Docteur Constance BAILLIE,** 

Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier de Valenciennes

# Anary Cie de l'illi

#### Faculté de Pharmacie

de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX 

© 03.20.96.40.40 - □: 03.20.96.43.64 http://pharmacie.univ-lille2.fr

#### Université de Lille

Président : Jean-Christophe CAMART

Premier Vice-président : Damien CUNY
Vice-présidente Formation : Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche : Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales : François-Olivier SEYS

Directeur Général des Services : Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe : Marie-Dominique SAVINA

#### Faculté de Pharmacie

Doyen: Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche: Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales: Philippe CHAVATTE

Assesseur à la Vie de la Faculté et aux

Relations avec le Monde Professionnel : Thomas MORGENROTH

Assesseur à la Pédagogie : Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité : Christophe BOCHU
Responsable des Services : Cyrille PORTA

#### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire	
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie	
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique	
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL	
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique	
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie	
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique	
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique	

M. STAELS Bart B	Biologie Cellulaire
------------------	---------------------

# Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSE	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

# Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie

Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
М	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
М	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie

M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

## **Professeurs Certifiés**

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mile	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

# Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

#### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

#### **AHU**

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie





# Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64 http://pharmacie.univ-lille2.fr

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

#### REMERCIEMENTS

Un très grand merci:

A toute l'équipe du laboratoire EA7366 :

Le Docteur Rodrigue Dessein pour m'avoir accueillie dans l'équipe de recherche et avoir dirigé ce travail de thèse, Je te suis très reconnaissante pour toutes les connaissances que tu m'as transmises lors de ces trois semestres passés au sein de l'EA 7366. Merci pour tes précieux conseils et ta disponibilité pour me conseiller, ta gentillesse, ton écoute et ta patience.

Le Docteur Rémi Le Guern et Teddy Grandjean pour leur aide précieuse tout au long des diverses étapes de ce travail et pour leur bienveillance, les Professeurs Eric Kipnis et Karine Faure pour leur rigueur et leurs conseils pertinents, ainsi que Marvin Baudoin, Frédéric Frenois, Claire Duployez pour leur aide technique et leur gentillesse qui m'ont permis d'achever sereinement cette étude

Au Professeur Damien Subtil, Je vous remercie de m'avoir accompagnée sur ce sujet de thèse et pour votre aide en particulier méthodologique. Je tiens à vous exprimer une reconnaissance particulière pour le temps que vous m'avez généreusement consacré. Je vous en remercie vivement et vous exprime mon profond respect.

Au Professeur Delphine ALLORGE, Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Je vous remercie pour votre écoute, votre soutien et votre bienveillance tout au long de mon internat. Merci pour votre investissement et la réelle attention que vous portez à chacun de vos internes.

Au Docteur Anne Goffard, Vous avez accepté de participer à ce jury et je vous en remercie. C'est avec un réel plaisir que j'ai assisté à vos enseignements durant mon cursus universitaire, merci pour votre dynamisme et votre pédagogie qui ont rendu vos cours si passionnants.

Au Docteur Etienne BROCHOT, Je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et pour votre disponibilité. Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous portez à ce travail. J'espère que vous l'apprécierez.

A Constance, Merci d'avoir accepté si spontanément de participer à mon jury de thèse! Merci pour ce petit grain de folie et ta bonne humeur tout au long de nos études de pharmacie.

A mes parents, pour m'avoir soutenu pendant toutes mes pérégrinations universitaires. Vous m'avez toujours encouragée et apporté toute votre affection

A mes amis, de pharma et d'ailleurs, et en particulier : Camille « cacahuète », Eva, Stéphanie, Camille Q, Françoise, Lise, Sophie, Rano, Mélodie, Sabrina, Malika, Charlène, Marina, Pierrot, Doudou et Romanus

À tous mes co-internes, de Picardie, de Lille et de Strasbourg,

... Pour tous les bons moments passés et à venir !

A Nabil,

Pour ton amour, ton âme d'enfant adorable et ton soutien inconditionnel

## LISTE DES ABREVIATIONS

Acct = Accouchement

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARNr = Acide ribonucléique ribosomique

**BPM** = Battements Par Minute

CRB = Centre de Ressources Biologiques

CRP = C Reactive Protein

Cq = Cycle de quantification

CST = Community State Type

ET = Ecart Type

IC = Intervalle de Confiance

IMC = Indice de Masse Corporelle

IMG = Interruption Médicale de Grossesse

LA = Liquide Amniotique

MUI = Mort In-Utero

NA = Non Applicable

OA = OpenArray®

OR = Odds Ratio

PCR = Polymerase Chain Reaction

PV = Prélèvement Vaginal

RPPH1 = Ribonuclease P RNA component H1

RR = Risque Relatif

SA = Semaines d'Aménorrhée

SGB = Streptocoque du groupe B

UFC = Unité Formant Colonie

USIN = Unité de soins intensifs néonataux

VB = Vaginose Bactérienne

# SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	14
TABLE DES ANNEXES	14
INTRODUCTION	14
I. Epidémiologie de la prématurité	14
II. La flore vaginale de la femme saine	15
III. La vaginose bactérienne	17
3.1. Définition et épidémiologie	17
3.2. Méthodes diagnostiques	18
IV. Infection et prématurité spontanée	19
4.1. Mécanismes de l'infection intra-utérine ascendante	19
4.2. Lien entre vaginose et prématurité	21
4.3. Echecs des traitements antibiotiques de la VB sur la prématurité	22
spontanée	22
V. Apport de la biologie moléculaire : vers l'étude PREMEVA 2	23
VI. Objectifs du travail de thèse	24
MATERIEL ET METHODES	25
I. Design de l'étude et participants	25
II. Procédure	25
III. Population d'étude	26
IV. Données colligées	27
V. Extraction d'ADN à partir des prélèvements vaginaux	28
VI. Quantification génique par PCR en temps réel de type Open Array®	30
VII. Contrôles qualité et quantification	32

VIII. Analyses statistic	ques				 	.34
I. Caractéristiques des	s patientes s	elon l'issue d	e grossesse		 	.37
II. Comparaison q l'accouchement						
III. Comparaison quar				•		
IV. Comparaison qual parmi les accouchem		_		_		
TABLEAUX					 	.40
DISCUSSION					 	.45
RÉFÉRENCES BIBLIO	GRAPHIQUE	S			 	.49

# **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Composition du microbiote vaginal	17
Figure 2 : Détail du score de Nugent	20
Figure 3 : Stades de l'infection intra-utérine ascendante	22
<b>Figure 4:</b> Extracteur KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor (Thermo F	isher
Scientific, USA)	30
Figure 5 : Principe du transfert des particules magnétiques	31
Figure 6: Schéma d'une lame Open Array®	32
Figure 7 : Diagramme des flux de l'étude	37

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques des patientes et des issues de
grossesse selon l'âge gestationnel à l'accouchement42
Tableau 2 : Comparaison des flores vaginales, présentées pour chaque bactérie
comme le nombre d'échantillons positifs, selon l'âge gestationnel à l'accouchement
43
Tableau 3 : Comparaison du nombre de log copies détectées pour chaque bactérie,
quand l'échantillon était positif, selon l'âge gestationnel à l'accouchement44
Tableau 4 : Comparaison des flores vaginales, présentées pour chaque bactérie
comme le nombre d'échantillons positifs, selon l'âge gestationnel à l'accouchement
chez les accouchements prématurés spontanés45
TABLE DES ANNEXES
Annexe 1 : Liste des 14 centres partenaires de l'étude et ayant signé convention
57
Annexe 2 : Fiche de Dépistage PREMEVA 2
Annexe 3 : Accord Comité de Protection des Personnes59

# **INTRODUCTION**

# I. Epidémiologie de la prématurité

La prématurité (naissance avant 37 semaines d'aménorrhée (SA) révolues) est la principale cause de morbidité et de mortalité périnatales dans les pays développés

(1). En France, elle concerne environ 7 % des naissances (2).

Les séquelles de la prématurité sont fréquentes dans la période néonatale et peuvent persister à l'âge adulte. Les conséquences sont s'autant plus délétères chez l'enfant que l'âge gestationnel à l'accouchement est bas. Ces conséquences sont représentées par les complications neurologiques à court terme qui regroupent des troubles du développement, tels que la paralysie cérébrale ou des déficiences visuelles et auditives et des complications à long terme comme les déficiences cognitives et motrices ou des troubles de l'attention (3).

La prématurité peut être subdivisée en deux groupes. La prématurité dite « provoquée » ou « iatrogène », qui survient lorsque l'accouchement doit être déclenché par l'équipe médicale dans le but de sauver la vie de la mère ou de l'enfant. La seconde est la prématurité « spontanée » qui est liée à une rupture prématurée des membranes ou à un travail prématuré à membranes intactes, en dehors de toute volonté médicale d'abréger la grossesse. Elle concerne environ 70 % de la prématurité globale (1).

Les causes de la prématurité spontanée apparaissent complexes et multifactorielles. Plusieurs facteurs maternels peuvent être impliqués tel que le diabète, le tabagisme, le faible poids de la mère ou encore un faible niveau socio-économique (1) (4) (5). Enfin, un facteur extra-maternel apparaît clairement en cause dans la prématurité spontanée qui est l'infection intra-utérine. Plusieurs études estiment qu'elle pourrait être en cause dans 25 à 40 % des naissances prématurées spontanées (1).

# II. La flore vaginale de la femme saine

La flore vaginale de la femme saine en période d'activité génitale est composée majoritairement de diverses espèces de lactobacilles formant un biofilm protecteur sur la muqueuse. Cette flore est regroupée sous l'appellation de « bacille de Döderlein » du nom du gynécologue allemand qui l'a découverte (6). Les lactobacilles de la cavité vaginale atteignent, en l'absence de pathologie, une concentration comprise entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>8</sup> ufc par gramme de sécrétion vaginale (7). Les lactobacilles de la flore vaginale de la femme saine appartiennent essentiellement aux espèces *L. crispatus* (59%), *L. gasseri* (16%), *L. iners* (22%) et

L. jensenii (3%) (8) (9) (10). L'activité de ces lactobacilles est essentielle pour préserver l'équilibre de la flore vaginale et prévenir les infections génitales. Les lactobacilles étant acidotolérants, le pH vaginal est un bon marqueur de la normalité de la flore vaginale. En conditions normales, Lactobacillus spp. hydrolysent le glycogène vaginal pour synthétiser de l'acide lactique, capable de maintenir le pH vaginal entre 3.8 et 4,5 inhibant ainsi la croissance de la plupart des pathogènes vaginaux sensibles à l'acidité (11). De plus, Lactobacillus crispatus produit également du péroxyde d'hydrogène, un puissant antimicrobien pouvant inhiber la croissance des bactéries anaérobies (6). Certaines espèces de lactobacilles, telles que L. iners, ne produisent pas de peroxyde d'hydrogène (12).

En proportions plus réduites, cette flore dominante est associée à des bactéries d'origine digestive, principalement anaérobies : *Peptostreptococcus species, Bacteroides species, Prevotella, Mobilincus, Capnocytophaga species, Porphyromonas species, Atopobium vaginae, Escherichia coli, Streptococcus agalactiae, Entecococus spp, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Fusobacterium, Gardenerella vaginalis* (7).

Plus récemment, l'utilisation de techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) a mis en évidence différents profils d'abondance bactérienne associés à la VB ou à la flore saine (13). Le microbiote vaginal des femmes en âge de procréer peut ainsi être divisé en différents types d'état communautaire bactérien (CST), dont le nombre exact est sujet à discussion car dépendant des méthodes utilisées. Chaque CST est dominé par une espèce majoritaire : *Lactobacillus crispatus* (CST I), *Lactobacillus gasseri* (CST II) et *Lactobacillus iners ou jensenii* (CST III) (14). En outre, des communautés de microbiote vaginal non dominées par les lactobacilles ont également été rapportées : les CST IV-A et IV-B se caractérisent par une proportion modérée de lactobacilles cohabitant avec d'autres espèces bactériennes dont des anaérobies strictes. Enfin, certains auteurs décrivent un cinquième CST correspondant à une dysbiose vaginale (figure 1) (13).

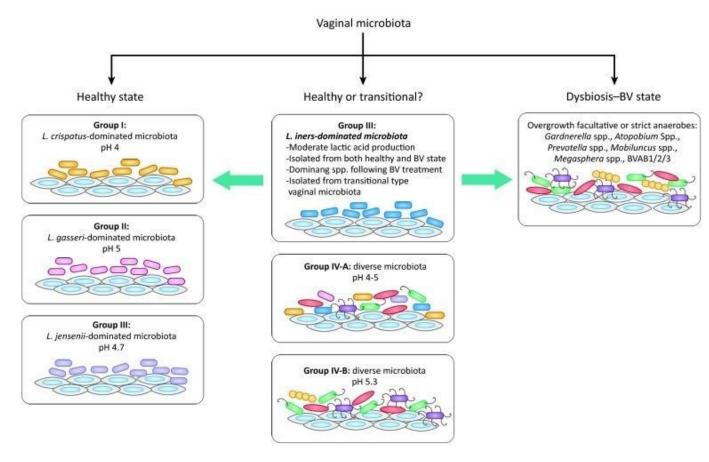


Figure 1 : Composition du microbiote vaginal (Petrova et al. 2017)

Le CST prédominant varie selon l'origine ethnique et également au cours du cycle mensuel de la femme saine. Dans l'étude de Ravel et Al., les auteurs concluent que les communautés bactériennes vaginales non dominées par les lactobacilles sont tout aussi fréquentes chez les femmes saines (14). Ces données remettent en cause le rôle central des lactobacilles dans la genèse de l'acidité vaginale. Il semble que d'autres bactéries du microbiote puissent se substituer aux lactobacilles pour générer l'acidité vaginale (15).

# III. La vaginose bactérienne

#### 3.1. Définition et épidémiologie

La vaginose bactérienne (VB) est le trouble le plus commun de la flore vaginale. Elle est caractérisée par une dysbiose se traduisant par une prolifération de bactéries anaérobies telles que *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, de bactéries

de croissance difficile et exigeantes en CO<sub>2</sub> comme *Gardnerella vaginalis* ou encore *Atopobium vaginae* et de bactéries intracellulaires comme *Mycoplasma hominis* (14) (16) (17). Cette expansion de bactéries coïncide avec une disparition des lactobacilles à l'origine d'un déséquilibre à la fois qualitatif et quantitatif de la flore vaginale. En cas de VB, la flore anaérobie peut ainsi pulluler jusqu'à atteindre 10 à 1000 fois la concentration bactérienne normale (11).

La prévalence de la VB est éminemment variable selon les études mais semble accrue chez les femmes d'origine africaine (18). Dans une étude de 2013, la prévalence de la VB est estimée à 58 % en Afrique du Sud mais dépasse rarement les 20% en Europe de l'ouest (19). De plus, dans le cadre de l'étude PREMEVA 1, la fréquence de la VB au premier trimestre de grossesse en Nord Pas de Calais a été estimée à 7,1% parmi plus de 14 000 femmes (20). Parmi les autres facteurs de risques d'acquisition d'une VB, citons le statut socio-économique bas, le tabagisme, les douches vaginales, le traitement antibiotique pour une autre affection, l'acquisition d'un nouveau partenaire sexuel et les antécédents récents de partenaires sexuels multiples (12) (18) (21)

#### 3.2. Méthodes diagnostiques

La VB peut être diagnostiquée par deux approches, une clinico-biologique et une purement bactériologique.

L'approche clinico-biologique recherche la présence de trois des quatre symptômes suivants définis par Amsel (22): 1) la présence de cellules indicatrices (clue-cells) à l'examen microscopique : cellules épithéliales pavimenteuses recouvertes de bactéries adhérentes ; 2) un pH vaginal supérieur à 4,5 ; 3) des leucorrhées homogènes et non inflammatoires recouvrant les parois vaginales de façon régulière et 4) une odeur de poisson émanant des pertes vaginales avec ou sans addition de 10% de KOH. La fiabilité des critères d'Amsel est discutée, notamment en cas de grossesse : les femmes enceintes pouvant ressentir une augmentation des pertes vaginales (23). De plus, en pratique, la moitié des VB s'avèrent asymptomatiques. L'utilité d'un examen bactériologique semble indiscutable.

L'approche bactériologique repose sur l'établissement du score de Nugent. Cette méthode consiste en la détermination de morphotypes bactériens, au microscope en

immersion à l'objectif x1000, à partir d'un étalement des sécrétions vaginales (24). Le dénombrement des trois morphotypes *Lactobacillus*, *Gardnerella* et *Mobilincus* après coloration de Gram, permet de classer la flore vaginale en 3 conditions : « normale » pour les frottis classés entre 0 et 3, « intermédiaire » pour les frottis classés entre 4 et 6 et anormale (« vaginose bactérienne ») pour les scores compris entre 7 et 10 (figure 2) (24). Cette méthode apparait comme plus fiable et reproductible que les critères d'Amsel. Ce score est également plus spécifique et plus sensible que le diagnostic clinique, très peu onéreux avec un délai d'obtention de 24 à 48 heures (25). Le score de Nugent est ainsi reconnu comme le gold standard du diagnostic de la VB (26).

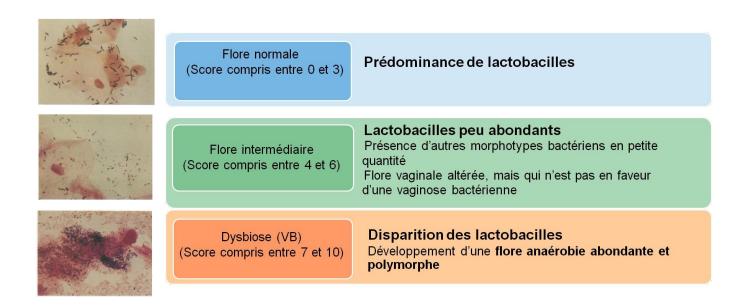


Figure 2 : Détail du score de Nugent

# IV. Infection et prématurité spontanée

#### 4.1. Mécanismes de l'infection intra-utérine ascendante

Une grande partie des naissances prématurées survient dans un contexte infectieux : l'infection intra-utérine maternelle est en effet suspectée dans 25% à 40% des cas de prématurité spontanée (27) (28) (29) (30).

La cavité utérine est réputée stérile ; moins de 1% des femmes ayant accouché à terme sont porteuses de bactéries dans le liquide amniotique (LA) (31). Par conséquent, l'isolement de bactéries dans ce milieu est vraisemblablement un marqueur d'infection. Les principaux microorganismes retrouvés dans le LA lors d'infection intra-utérines sont les mycoplasmes génitaux et en particulier *Ureaplasma urealyticum et Mycoplasma hominis*. Mais de nombreux autres microorganismes ont été identifiés tels que *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium* ou *Gardnerella vaginalis* (30).

Ces micro-organismes isolés du LA sont similaires à ceux retrouvés dans le tractus génital inférieur notamment en cas de VB (32). Ils sont considérés peu pathogènes mais capables d'activer le système immunitaire inné et de déclencher la cascade inflammatoire (relargage des cytokines pro inflammatoires : prostaglandines et métalloprotéases). Cette réponse inflammatoire induirait à terme une maturation du col et des contractions pouvant aboutir à une rupture prématurées des membranes et à l'accouchement prématuré (33) (34).

Plusieurs études suggèrent que la présence *d'U.urealyticum* dans le LA dès la vingtième semaine de grossesse est associée à une infection infraclinique chronique qui déclencherait la naissance prématuré. Ces infections intra-utérines semblent donc résulter d'une infection/colonisation vaginale débutant précocement lors de la grossesse qui remonterait progressivement dans l'utérus (29) (35).

L'infection intra-utérine ascendante se déroulerait en 4 stades. Le stade I correspond à une infection cervico-vaginale ou une VB avec prolifération de germes anaérobies (VB) ou autres germes de la flore digestive (*E. coli*) aux dépends des lactobacilles. Les bactéries sembleraient infecter ensuite la cavité intra-utérine au niveau de la décidua (stade II) puis s'étendre aux membranes, au LA (stade III) et finalement au fœtus (stade IV). Tous les stades ne sont pas forcément atteints lorsque l'accouchement prématuré est déclenché par l'infection (figure 3) (30) (36).

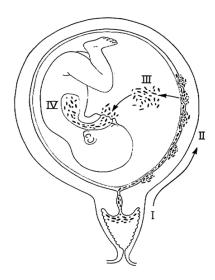


Figure 3 : Stades de l'infection intra-utérine ascendante (Romero et al. 2001)

#### 4.2. Lien entre vaginose et prématurité

De nombreuses études ont montré une association statistique significative entre la présence d'une VB et la prématurité (37) (27) (38). Ce lien s'accentuerait avec la gravité de la prématurité et la détection précoce des anomalies de la flore. La métaanalyse de Leitich et al. publiée en 2003 évalue l'augmentation du risque de prématurité à 2.19 (IC 95 % : 1.54 - 3.12) au sein des patientes porteuses de VB. Ce risque s'élève à 4.2 (IC 95 % : 2.1 – 8.4) lors d'un dépistage avant 20 SA et même à 7.5 (IC 95 % : 1.8 – 31.6) avant 16 SA. Cependant d'autres auteurs tempèrent ces allégations et concluent que l'âge gestationnel au moment du diagnostic de la VB n'influence pas la force du lien (39).

En 2007, Leitich et al. actualisent leur méta-analyse de 2003 et retrouvent la même force d'association (OR : 2,16 ; IC 95 % : 1,56 - 3,00) en étoffant leur analyse de 14 études et 10 286 patientes (32 études et 30 518 patients au total). Cette fois, la notion de précocité du diagnostic influençant le risque disparaît sans remettre en cause le lien entre VB et prématurité (40).

Ces conclusions ont motivé la réalisation de nombreuses autres études cherchant à retrouver cette association avec des résultats très divergents (41) (42) (43), le lien reliant VB et prématurité tendant à s'amoindrir avec les études récentes. Les études françaises étudiant le lien entre VB et prématurité sont peu nombreuses. Goffinet et

al. retrouvent une association entre présence de BV et accouchement < 33 SA mais avec une faible valeur prédictive (32).

# 4.3. Echecs des traitements antibiotiques de la VB sur la prématurité

#### spontanée

Dès 1991, dans le cadre d'essais randomisés, de nombreux auteurs ont étudié l'impact du traitement de la VB sur la réduction de la prématurité spontanée (44) (45) (46). Ce traitement devait être actif sur les bactéries anaérobies de la VB et présenter une totale innocuité vis-à-vis de la mère et du l'enfant. L'intérêt s'est progressivement concentré sur deux molécules : la clindamycine et le métronidazole (47) (48).

En France, l'engouement est immédiat. Ainsi, dès 2001, l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (nouvellement Haute Autorité de Santé) recommande de dépister la VB par examen direct en cas d'antécédent d'accouchement prématuré et de traiter systématiquement les VB asymptomatiques. Ce traitement fait appel au métronidazole per os (1 g/j pendant 7 jours ou 2 g en dose unique) (49).

Par la suite, deux méta-analyses ont entrepris d'évaluer les effets du traitement antibiotique de la VB pendant la grossesse. En 2013, Brocklehurst et al incluent 15 essais randomisés et 5888 femmes avec un diagnostic positif pour la VB. Au total, ils concluent sur l'efficacité de l'antibiothérapie pour l'éradication de la VB lors de la grossesse (RR: 0,42; IC 95%: 0,31 - 0,56) mais ne montrent pas de tendance à faire diminuer le risque de prématurité avant 37 SA (RR: 0,88; IC 95%: 0,71 - 1,09) (50). En 2011, Lamont et al. analysent cinq essais incluant 2346 femmes. Ils affirment qu'un traitement par clindamycine avant 22 SA est efficace sur le risque d'accouchement prématuré comparé au placebo (RR 0,60; IC 95 %: 0,42 - 0,86) mais concluent sur la nécessité de conduire des essais randomisés de puissance supérieure (51). C'est chose faite avec la publication en 2018 des résultats de l'essai multicentrique randomisé en double aveugle PREMEVA 1 (52).

Cette étude était de taille robuste : 84 530 femmes enceintes ont été dépistées avant la 14e semaine d'aménorrhée pour la VB en France entre 2006 et 2011 permettant d'inclure 2869 patientes. Ce projet a cherché à évaluer si une antibiothérapie par clindamycine, menée précocement lors de la grossesse, permettait de réduire le risque de complications obstétricales liées à une VB. Finalement, le taux d'accouchement prématuré était similaire chez les femmes traitées par clindamycine et par placebo (1,2% pour les femmes traitées contre 1,0% avec placebo).

Les études les plus récentes ne sont donc pas en faveur d'un dépistage systématique de la vaginose ni de son traitement antibiotique pour prévenir la prématurité.

#### V. Apport de la biologie moléculaire : vers l'étude PREMEVA 2

La remise en question du lien entre vaginose et prématurité ne peut cependant pas occulter le contexte infectieux indiscutable d'une grande partie des naissances prématurées. L'apport récent des outils de biologie moléculaire a permis de formuler de nouvelles hypothèses sur les mécanismes qui amènent à la prématurité en permettant l'isolement de bactéries fastidieuses ou non cultivables (53) (30).

De plus, la PCR (polymerase chain réaction) quantitative a permis d'améliorer la sensibilité de la détection des microorganismes dans le LA. Dans une étude menée entre 2004 et 2007 chez 46 femmes en menace d'accouchement prématuré, Han et al relèvent que la prévalence des germes dans le LA détectée par PCR était supérieure à celle déterminée par culture. En outre, deux tiers des microorganismes retrouvés dans le LA étaient des bactéries non cultivables ou difficiles à cultiver. Les germes les plus fréquemment retrouvés étaient : Fusobacterium, Ureaplasma, Leptotrichia, Streptococcus agalactiae, Bacteroides et Mycoplasma (54). En 2003, yoon et al. concluent que les patientes présentant un travail prématuré avec une PCR positive mais une culture négative du LA pour *U. urealyticum* sont à risque d'accouchement prématuré imminent et d'évolution périnatale défavorable (55).

Ainsi les outils de biologie moléculaire permettent d'envisager de nouvelles pistes dans la compréhension de la pathogenèse de l'accouchement prématuré lié à l'infection.

L'étude PREMEVA 2 s'inscrit dans cette perspective - en partant du constat de

PREMEVA 1 et de l'inefficacité du traitement spécifique de la VB pour prévenir la prématurité - cette seconde étude vise à découvrir de nouveaux marqueurs prédictifs de la prématurité en s'aidant des outils de biologie moléculaires les plus récents.

Pour cette étude, l'intérêt s'est porté sur la détection de bactéries au premier trimestre de grossesse avant que les mécanismes de la prématurité ne soient enclenchés. L'analyse de microorganismes vaginaux par PCR en temps réel pourrait révéler un lien plus intense de certaines de ces bactéries avec la prématurité spontanée, comparativement à la VB repérée par le score de Nugent.

#### VI. Objectifs du travail de thèse

Dans le cadre de l'étude PREMEVA 2, notre travail s'est attaché à réexaminer la relation entre la composition de la flore vaginale au premier trimestre de la grossesse et la survenue d'un accouchement prématurité. Nous avons étudié le lien entre la présence de 15 micro-organismes connus comme protecteurs ou défavorables à l'équilibre microbien vaginal sur le risque de prématurité spontanée. Ces bactéries sont de culture délicate et l'approche moléculaire est le seul moyen fiable aujourd'hui de les détecter de manière sensible et reproductible. Notre approche pour les identifier a été d'utiliser une technique de PCR en temps réel (qPCR) de type Open Array®.

**MATERIEL ET METHODES** 

I. Design de l'étude et participants

PREMEVA 2 est une étude multicentrique cas-témoins nichée dans une cohorte

prospective faisant suite à l'essai randomisé PREMEVA 1. Entre décembre 2011 et

juin 2013, toutes les femmes enceintes du Nord-Pas-de-Calais se sont vues proposer

la participation à cette étude lors de leur première consultation de grossesse. Après

avoir obtenu leur consentement écrit, les patientes étaient invitées à effectuer

gratuitement deux auto-prélèvements vaginaux dans le laboratoire d'analyse médicale

de leur choix.

П. **Procédure** 

L'un des deux prélèvements, un écouvillon sec (COPAN, Brescia, Italia), était étalé sur

lame dans les deux heures pour dépister la VB au moyen du score de Nugent. Après

coloration de Gram, le score était établi en additionnant le nombre de points

correspondant à l'abondance des Lactobacilles (0 à 4), des Gardnerella (0 à 4) et celle

des Mobiluncus (0 à 2). Le résultat était transmis au médecin prescripteur et à la

patiente:

Score de Nugent ≤ 6 : flore considérée comme normale.

Score de Nugent ≥ 7 : Vaginose Bactérienne.

Dans le cadre de l'essai PREMEVA1, Une formation à la réalisation du score de

Nugent a été réalisée dans chacun des 149 laboratoires de biologie médicale de notre

région. Trois biologistes investigateurs indépendants ont relu plusieurs milliers de

lames afin de s'assurer de la qualité de standardisation de la lecture des lames tout

au long de la période de recrutement des femmes et entre les différents laboratoires.

25

Ce contrôle qualité a montré une concordance satisfaisante entre lectures et relectures (coefficients kappas > 0.80) (52).

Les seconds prélèvements vaginaux ont été déversés dans 1 millilitre de milieu de transport Amies (Eswab™) et congelés à -80°c dans chaque laboratoire d'analyse médicale. A la fin de l'étude, les tubes ont été transférés au Centre des Ressources Biologiques (CRB) du CHRU de Lille pour l'extraction ultérieure de l'ADN bactérien et la qPCR, dans le cadre de ce travail.

# III. Population d'étude

Les participantes étaient éligibles, au moment du prélèvement, si leur âge gestationnel était inférieur à 15 SA et qu'elles prévoyaient d'accoucher dans une maternité de notre région. Elles devaient être âgées de 18 ans ou plus, parler et comprendre le français et pouvoir donner un consentement éclairé (Annexe 2). Afin de concentrer l'étude sur les lieux de naissance des enfants prématurés, la survenue de l'accouchement dans un des 14 centres de type 2 ou 3 de la région a été ajoutée aux critères d'inclusion (Annexe 1).

#### Les patientes « cas »

Il s'agit de toutes les femmes ayant présenté un accouchement prématuré spontané et ayant bénéficié d'un prélèvement vaginal dans le cadre de l'étude PREMEVA2. Les accouchements considérés comme prématurés et spontanés sont ceux survenus entre 22<sup>+0</sup> et 36<sup>+6</sup> SA, suite à une ouverture spontanée du col ou une rupture prématurée des membranes. Les critères d'exclusion des cas étaient : une grossesse multiple, le décès in utero, un accouchement par césarienne ou par déclenchement artificiel pour pathologie fœtale/maternelle autre qu'une prématurité spontanée/rupture prématurée des membranes.

#### Les patientes « témoins »

Il s'agit de la première femme ayant accouché à terme à la suite de la patiente « cas » dans la même maternité. L'accouchement devait être survenu après 37 SA quelle que soit la voie d'accouchement et la nature du travail. Les critères d'exclusion des témoins étaient : une grossesse multiple, le décès in utero et un âge gestationnel < 37 SA. Pour le choix de chaque patiente témoin, un appariement était effectué avec la patiente « cas » sur l'existence d'un prélèvement vaginal PREMEVA2, ainsi que sur le lieu et le jour de la naissance.

L'étude a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes de l'interrégion Nord-Ouest le 5 janvier 2012 (annexe 3).

# IV. Données colligées

Lors du recueil de données chez les cas et témoins, un cahier d'observation a été rempli à partir des dossiers obstétricaux. Les données suivantes ont été relevées :

- la vérification des critères d'inclusion et d'exclusion des cas et des témoins
- les données maternelles et antécédents obstétricaux de la patiente : âge, niveau d'étude, tabagisme en début de grossesse, indice de masse corporelle, parité, antécédent d'accouchement prématuré
- les données concernant la grossesse : mise en évidence d'une infection urinaire, d'une menace d'accouchement prématuré, de métrorragies au 2e ou 3e trimestre, d'un diabète gestationnel, d'une hypertension artérielle, du portage vaginal d'un streptocoque B après le 1er trimestre, de la survenue d'une rupture prématurée des membranes (> 12h avant l'accouchement) ainsi que la présence de signes anténataux de chorioamniotite ( au moins deux signes parmi l'existence d'une fièvre maternelle >38°C, la survenue de métrorragies avant le travail, d'un écoulement vaginal purulent ou nauséabond, d'une tachycardie maternelle ≥100 bpm, d'une tachycardie fœtale >160 bpm, d'une CRP maternelle □15 mg/L ou d'une leucocytose maternelle □15 000 / mm3)

- les données concernant l'accouchement : nature du travail et mode d'accouchement, survenue d'une hyperthermie ainsi que l'administration d'une antibiothérapie au cours du travail
- les données concernant le nouveau-né : genre et poids de naissance, score d'Apgar, la survenue d'un transfert en unité de soins intensifs néonataux (USIN), la durée de séjour en néonatologie ainsi que son éventuel décès avant sa sortie d'hospitalisation.

#### V. Extraction d'ADN à partir des prélèvements vaginaux

Une semaine avant l'extraction, les écouvillons à analyser ont été transférés sur carboglace au laboratoire où ils ont été stockés à -80 ° C. L'ADN bactérien vaginal a tout d'abord été isolé grâce au kit MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra (Thermo Fisher Scientific, USA). Nous avons :

- Décongelé puis dilué les écouvillons vaginaux dans 2 ml de PBS stérile.
- Transféré 1 ml de chaque PV dans un tube de lyse 1.5 ml puis centrifugé pendant 15 minutes à 2250 g pour concentrer les échantillons.
- Incubé les échantillons pendant 15 minutes à 65 °avec 200 µl de mélange préliminaire de digestion

Composant	Volume par échantillon	Fonction
B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent	185 µl	Réactif d'extraction de protéines bactériennes
Lysozyme Solution	10 µl	Enzyme de lyse des parois cellulaires bactériennes
Zymolyase solution	200 µl	Enzyme de digestion des levures et parois cellulaires fongiques

• Incubé chaque échantillon pendant 15 minutes à 65°C avec 50 µl de mélange contenant de la protéinase K afin de dénaturer et séparer les protéines de l'extrait cellulaire

- Ajouté à chaque échantillon 125 µL de tampon de lyse à ADN
- Ajouté 40 μL de mélange « Billes / RNase A » à chaque échantillon afin d'éliminer l'ARN et de permettre la liaison réversible de l'ADN aux billes magnétiques
- Transféré chaque échantillon dans les puits d'une plaque deep Well 96 et procédé au traitement des échantillons sur l'extracteur KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor (Thermo Fisher Scientific, USA).



**Figure 4:** Extracteur KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor (Thermo Fisher Scientific, USA)

Cet appareil assure la purification automatisée de l'ADN par séparation magnétique. Cette technique est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface (billes magnétiques) recouverte d'un groupe fonctionnel qui interagit spécifiquement avec l'ADN. Après liaison de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants et lavées.

Finalement, l'ADN purifié est élué par le tampon d'élution final. Le *KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor* fonctionne suivant le principe du traitement inverse des particules magnétiques. Plutôt que de déplacer les réactifs liquides, les particules magnétiques sont déplacées d'une plaque à l'autre à l'aide de tiges magnétiques

recouvertes d'un peigne en plastique jetable. Ce système permet le transfert des billes à travers les différentes phases de purification - liaison, mélange, lavage et élution (figures 4 et 5). Cet extracteur permet une excellente reproductibilité et un rendement optimal. Le volume d'élution final était de 60 µl. Les plaques d'élution finales ont été conservées à -80°C en attente de leur traitement par qPCR.

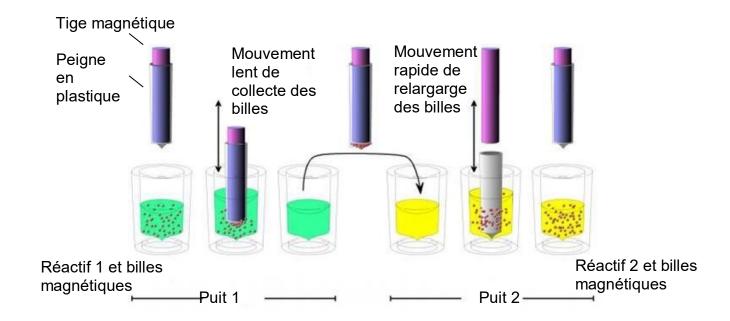


Figure 5 : Principe du transfert des particules magnétiques

# VI. Quantification génique par PCR en temps réel de type Open Array®

La technologie qPCR OpenArray<sup>®</sup> (OA) est une plateforme de PCR en temps réel nanofluidique à haut débit nécessitant de très faibles volumes d'échantillons cliniques. Dans cette étude nous avons utilisé des lames permettant de tester 48 échantillons pour 18 cibles (15 bactéries et 3 contrôles qualité) en triplicat. Une lame OA présente 48 sous-réseaux contenant chacun 64 puits de 33 nl.

Les sondes TaqMan et les amorces sont préchargées à l'intérieur de chaque puits.

Les sondes sont marquées à l'extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter : FAM) et à l'extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher : NFQ-MGB), qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, alors elle est hydrolysée par l'activité 3'-5'

exonucléasique de l'ADN polymérase. Le reporter, ainsi séparé du quencher, émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. Les réactifs sont maintenus dans les puits grâce à la tension de surface générée par le revêtement hydrophile des puits et la surface hydrophobe de la matrice (figure 6).

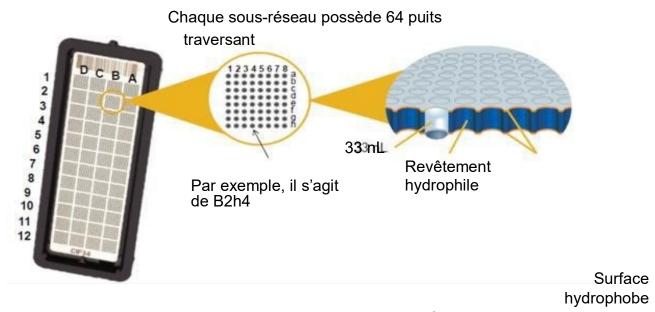


Figure 6: Schéma d'une lame Open Array®

Dans notre étude, nous avons étudié le lien entre les micro-organismes suivants et la prématurité : Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis, BVAB2, Megasphera 1, Megasphera 2, Prevotella bivia, Bacteroides fragilis, Mobiluncus curtisii, Mobiluncus mulieris, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners et Lactobacillus jensenii.

#### Protocole de la PCR en temps réel Nous

avons:

- Préparé la plaque d'échantillonnage 384 puits selon le plan préétabli en remplissant chaque puit avec 2,5 µl d'échantillon d'ADN et 2,5 µl de mélange réactionnel « TaqMan OA Real-Time PCR Master Mix »
- Centrifugé la plaque pour éliminer les bulles d'air
- Inséré la plaque d'échantillonnage OA 384 dans le système AccuFill ™. Il s'agit d'un système robotique qui prélève les échantillons et les transfère dans les puits de chaque lame OA par capillarité.
- Scellé chaque lame OA avec un revêtement en plastique directement après l'achèvement du chargement pour éviter l'évaporation des réactifs.
- Puis injecté lentement un liquide d'immersion (huile inerte) pour couvrir les puits ce qui évite également l'évaporation.

Quatre lames OpenArray® sont ensuite chargées et analysées par le thermocycleur QuantStudio 12K ™ suivant le programme d'amplification suivant : 50 ° C pendant 15 secondes, 91 ° C pendant 10 minutes, suivies de 50 cycles à 54 ° C pendant 170 secondes et à 92 ° C pendant 45 secondes.

# VII. Contrôles qualité et quantification

Le procédé d'extraction a été validé dans chaque série par un contrôle interne fourni par le fabricant du kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Il se compose de cellules de levures transformées qui contiennent un plasmide multi-cibles linéarisé portant les séquences de chaque cible du microbiote vaginal à amplifier. De plus, le plasmide contient les séquences cibles pour les gènes procaryotes de l'ARNr 16S et de la RNase P RPPH1 humaine pour la détection générale d'ADN bactérien et humain.

Des contrôles positifs d'amplification sont introduits dans chaque cycle.

Il s'agit également d'un plasmide portant les séquences de chaque cible à détecter de concentration connue 10<sup>5</sup> copies par µl, ainsi que des séquences cibles pour les gènes de l'ARNr 16S procaryote et de la RNase P RPPH1 humaine. Les puits de contrôles négatifs ont permis de s'assurer qu'aucun acide nucléique contaminant n'a été

introduit dans le mélange réactionnel ou dans les échantillons pendant les manipulations. La quantification des populations bactériennes des différents échantillons est obtenue en se référant à une droite d'étalonnage. Ces courbes standard ont été générées en utilisant 5 dilutions successives au 10e du contrôle d'amplification.

La technologie OA permet la détection les cibles à partir de 100 copies d'ADN par µL d'échantillon. Le système présente une spécificité et une reproductibilité ≥ 95 %.

#### VIII. Analyses statistiques.

Les cahiers d'observations ont été saisis informatiquement avec le logiciel Epi-Data software (Epidata Software, version 3.1, Danemark).

Les données de qPCR ont été retraitées informatiquement et triées pour obtenir un set de données homogènes et interprétables. Les puits qui ne répondaient pas aux critères suivants étaient éliminés : ROX > 2000, amplification satisfaisante du gène de l'ARNr 16 s et de la RNase humaine (Cq < 31). La ROX (carboxy-X-rhodamine) est utilisée comme colorant de référence passif afin de compenser les variations d'intensité de fluorescence dues aux différences de longueur du chemin optique entre les puits, aux légères différences de volumes d'échantillon déposés et à d'éventuelles bulles dans les puits. Le Cq utilisé pour l'ensemble des calculs résulte de la moyenne des Cq de la cible considérée (car pour chaque échantillon la cible est amplifiée en triplicat). L'ensemble des échantillons ainsi sélectionnés (au nombre de 606) a constitué notre base de données.

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SAS (SAS Institute version 9.4). Les variables qualitatives ont été décrites en termes de fréquence et de pourcentage. Les variables numériques gaussiennes ont été décrites en termes de moyenne et de déviations standard et les variables numériques non gaussiennes en termes de médiane et d'intervalle interquartiles. La normalité des variables numériques a été vérifiée graphiquement et testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

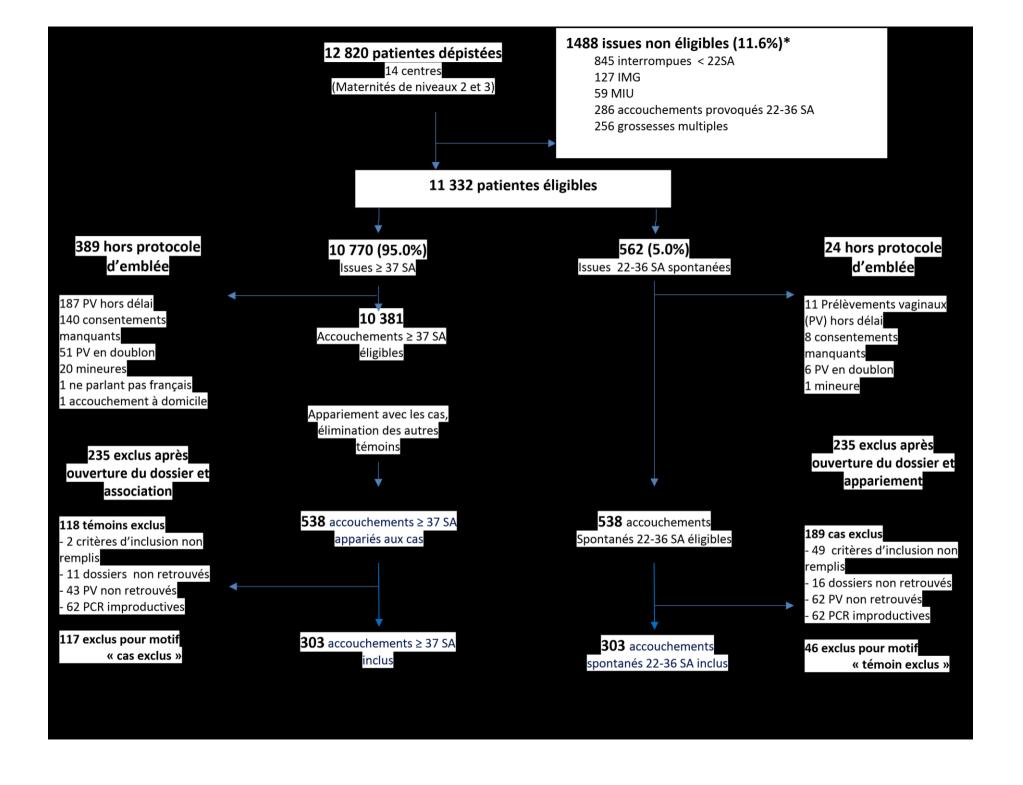
Les caractéristiques des patientes, la flore vaginale et les issues de grossesses ont été comparées entre les accouchements prématurés spontanés et les accouchements à terme à l'aide de modèles linéaires mixtes généralisés (distribution binaire, lien logit) incluant la maternité d'accouchement comme effet aléatoire. Concernant les bactéries cibles de la flore vaginale, les comparaisons ont été ajustées sur le statut tabagique. Au sein des accouchements prématurés spontanés, la composition de la flore vaginale a été comparée selon l'âge gestationnel à l'accouchement à l'aide d'un modèle linéaire mixte généralisé ordinal (distribution multinomial, lien cumlogit) incluant la maternité d'accouchement comme effet aléatoire. Tous les tests étaient bilatéraux et ont été réalisés avec un niveau de significativité de 5%.

## **RESULTATS**

Pendant la période d'étude, 12 820 patientes ont réalisé l'auto-prélèvement PREMEVA 2 et ont accouché dans l'un des 14 centres de niveaux 2 et 3 sélectionnés pour l'étude. Parmi ces femmes, 1 488 (11.6%) n'étaient pas éligibles (Figure 6). Parmi les 11 332 patientes éligibles, 562 ont présenté un accouchement prématuré spontané entre 22 et 36<sup>+6</sup> SA et composaient le groupe des cas (5.0 %).

Au sein de ce groupe, 24 femmes étaient hors protocole d'emblée du fait de consentements manquants, de prélèvements vaginaux (PV) hors délai ou d'un âge maternel non conforme, permettant d'inclure 538 cas. Concernant les patientes ayant accouché à terme (≥ 37 SA), 389 patientes ont été exclues car hors protocole. Après appariement avec les cas sur le lieu et le jour de la naissance, nous avons inclus dans l'étude 538 accouchements spontanés éligibles et leurs 538 témoins.

Suite au recueil de données obstétricales et à l'analyse par qPCR, 235 patientes ont été exclues secondairement dans chacun des groupes dont 103 du fait de la nonconformité ou de la perte des PV (9.7%), 124 du fait d'amplification de PCR inexistantes ou non satisfaisantes (11.5%), 50 du fait de critères d'inclusion non remplis – accouchement prématuré provoqué, multiparité ou âge gestationnel erroné (4.6%) et 27 du fait de données manquantes concernant l'accouchement (2.5%), En outre, 163 patientes ont été exclues du fait de l'exclusion de leur cas ou témoin apparié (15.1%). L'analyse finale des données de PCR a porté sur 303 cas et 303 témoins.



### I. Caractéristiques des patientes selon l'issue de grossesse

Parmi les accouchements prématurés spontanés, 262 ont eu lieu entre 33 et 36<sup>+6</sup> SA (86.4%), 29 entre 28 et 32<sup>+6</sup> SA (9.6%) et 12 entre 22 et 27<sup>+6</sup> SA (4.0%).

Les caractéristiques des femmes et les issues de grossesses figurent au Tableau 1. Par rapport aux accouchements à terme, les femmes ayant accouché prématurément étaient plus souvent fumeuses (23.8 vs 17.6%, p=0.061), avaient un IMC plus faible (23.2 ± 4.6 vs 24.4 ± 6.4, p=0.008). Parmi les femmes multipares, les femmes ayant accouché prématurément avaient plus souvent un antécédent d'accouchement prématuré (15.5 vs 5.6 %, p<0.001). Au cours de la grossesse, elles avaient présenté plus fréquemment une infection urinaire (15.9 vs 7.3%, p=0.001) ou un portage vaginal de streptocoque B (22.5 vs 10.9%, p<0.001). On retrouvait plus fréquemment une rupture prématurée des membranes supérieure à 12 heures, ainsi que des signes anténataux de chorioamniotite (10.3% vs 1.3%, p<0.001). Le taux de transfert en soins intensifs néonataux était beaucoup plus élevé en cas de prématurité, ce qui était attendu. Cinq décès néonataux précoces ont été constatés dans le groupe des naissances prématurées (1.7%) et aucun dans le groupe témoin.

# II. Comparaison qualitative des flores vaginales selon l'âge gestationnel à l'accouchement

En ce qui concerne la flore vaginale au premier trimestre de la grossesse, la répartition des scores de Nugent étaient similaires entre les femmes ayant accouché prématurément et leurs témoins (Tableau 2). La médiane du score était de 1 dans les 2 groupes (p=0.25). La répartition entre flore normale, intermédiaire et VB était similaire dans chaque bras de l'étude (9.8 % de VB chez les cas contre 10.3% chez les témoins).

Suite à l'étude par qPCR des prélèvements vaginaux, l'analyse qualitative a montré que 3 bactéries étaient significativement plus fréquentes dans la flore vaginale des patientes cas, après ajustement sur le statut tabagique. En effet, 22 échantillons étaient positifs pour *Mycoplasma hominis* chez les patientes cas contre 10 chez les

témoins (7.3% des cas vs 3.3% chez les témoins, p=0.034). *Ureaplasma urealyticum* était présent dans 133 échantillons chez les cas (43.9% des PV vs 34.0 % chez les témoins, p=0.013). Enfin, *Lactobacillus iners* était rencontré plus fréquemment chez les cas avec 213 échantillons positifs contre 184 chez les témoins (70.3% des PV contre 60.7% chez les témoins, p = 0.014).

Concernant les 12 autres bactéries recherchées par qPCR, leurs fréquences ne variaient pas de manière significative selon l'âge gestationnel au prélèvement avant 14 SA. *Lactobacillus crispatus* est la bactérie la plus fréquente dans la flore vaginale du 1<sup>er</sup> trimestre, après *L.iners*, avec au total 350 échantillons positifs. La présence de *L.crispatus* a été détectée de façon similaire chez les cas et les témoins (59.4 % échantillons positifs chez les cas contre 56.1 % chez les témoins, p=0.410). Les deux autres espèces de lactobacilles analysées ont également été largement retrouvées dans les échantillons vaginaux : 244 PV positifs pour *L.gasseri* et 243 positifs pour *L.jensenii*.

La troisième bactérie rencontrée le plus fréquemment a été *Prevotella bivia* avec un total de 312 échantillons positifs (49.5 % échantillons positifs chez les cas contre 53.5 % chez les témoins, p=0.330). *Gardnerella vaginalis* était également fréquemment détectée avec 253 échantillons positifs au total (40.6 % échantillons positifs chez les cas contre 42.9 % chez les témoins, p=0.570). *Atopobium vaginae* a cumulé 153 échantillons positifs (25.8 % échantillons positifs chez les cas contre 26.7 % chez les témoins, p=0.580). *BVAB2* était, quant à elle, présente dans 56 échantillons (8.9 % d'échantillons positifs chez les cas contre 9.6 % chez les témoins, p=0.780). *Megasphera* 1 et 2 ne cumulent à eux deux que 70 échantillons positifs. Les *Mobiluncus*, *M.curtisii* et *M.mulieris* n'ont été détectés que dans 27 échantillons au total sans différence de répartition entre les cas et témoins. Enfin, *Bacteroides fragilis* était également particulièrement rare dans les PV analysés avec seulement 3 échantillons contenant cette bactérie.

# III. Comparaison quantitative des flores vaginales selon l'âge gestationnel à l'accouchement

Les échantillons ont également étaient analysés sur le versant quantitatif.

L'abondance des 15 espèces bactériennes a été déterminée dans les PV quand l'échantillon était positif pour la bactérie (Tableau 3).

Cette analyse a montré que *Lactobacillus crispatus* était plus abondant, en nombre de log copies chez les patientes témoins  $(6.98 \ [6.34 - 7.26] \ log$  de copies) contre  $6.63 \ [3.78 - 7.10]$  log de copies chez les cas (p <0.001). L'abondance de l'ensemble des autres bactéries n'était pas significativement différente entre les deux bras de l'étude. On peut noter que certaines espèces étaient particulièrement abondantes lorsqu'elles étaient présentes dans les échantillons. Parmi elles, on a pu relever l'abondance de *L.iners*  $(6.02 \ [3.91 - 6.90] \ log$  de copies chez les cas et  $6.10 \ [3.65 -$ 

7.09] chez les témoins, p =0.370). *Megasphera 1* n'était détectée que dans 63 PV au total mais en quantité conséquente (6.29 [2.45 - 7.30] log de copies dans 30 PV positifs chez les cas et 6.68 [2.81 - 7.54] chez les témoins, p =0.370).

Parmi les espèces les plus fréquemment détectées (302 échantillons positifs), Prevotella bivia était relativement peu abondante (3.54 [2.89 - 4.16] log de copies dans 150 PV positifs chez les cas et 3.60 [3.02 - 4.30] chez 162 PV témoins, p =0.370).

Les 2 mycoplasmes, *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* étaient relativement peu abondants. Les 133 PV positifs chez les cas pour *U.urealyticum* contenaient 3.84 [3.15 - 4.41] log de copies contre 3.75 [3.12 - 4.27] log de copies chez les 103 PV témoins (p=0.490). Concernant *M.hominis*, 22 PV positifs chez les cas contenaient 4.40 [3.75 - 5.10] log de copies contre 4.38 [3.24 - 5.27] log de copies chez les 10 PV témoins (p=0.860).

# IV. Comparaison qualitative des flores vaginales selon l'âge gestationnel à l'accouchement parmi les accouchements prématurés spontanés

Enfin, les flores vaginales ont été comparées selon l'âge gestationnel à l'accouchement parmi les accouchements prématurés spontanés. Nous n'avons relevé aucune différence significative de fréquence pour chacune des 15 bactéries selon le stade de prématurité au sein du groupe des cas (Tableau 4).

En particulier, *Lactobacillus crispatus* est retrouvé de façon similaire en cas de prématurité extrême 22-27<sup>+6</sup> dans 6 PV sur 12 (50% des échantillons), 17/29 en cas de grande prématurité 28-32<sup>+6</sup> (58.6%) et 157/262 (59.9%) en cas de prématurité modérée 33-36<sup>+6</sup> (8.9%) (p=0.530). *Ureaplasma urealyticum* est aussi fréquent en cas de prématurité extrême (7/12 PV, 58.3% des échantillons), qu'en cas de grande prématurité 28-32<sup>+6</sup> (14/29 PV, 48.3%des échantillons) et de prématurité modérée (112/262 PV, 42.8% des échantillons) (p=0.430). Enfin, *L.iners* était détecté de la même façon entre les 3 sous-groupes de prématurité (respectivement 66.7%, 72.4% et 70.2%, p=0.94). *Prevotella bivia* était détectée plus fréquemment en cas de prématurité extrême (66.7% des PV) que dans les autres stades (respectivement 31% des PV et 50.8% des PV) sans que cette différence ne soit significative (p=0.360).

### **TABLEAUX**

**Tableau 1 :** Comparaison des caractéristiques des patientes et des issues de grossesse selon l'âge gestationnel à l'accouchement

Prématurité spontanée 22-36 <sup>+6</sup> ( <b>n=303</b> )	Naissance à terme ≥ 37 SA (n=303)	p
---	--	---

Caractéristiques			
Âge, années (moyenne ± DS)	29.4 ± 4.9	29.4 ± 5.0	0.97
Niveau d'étude < baccalauréat	110 (39.3)	100 (35.0)	0.29
Tabagisme en début de grossesse	71 (23.8)	52 (17.6)	0.061
IMC, kg/m² (moyenne ± DS)	23.2 ± 4.6	24.4 ± 6.5	0.008
Multipares	180 (59.4)	176 (58.1)	0.74
Antécédent d'accouchement prématuré	47 (15.5)	17 (5.6)	<0.001
Grossesse, accouchement, état néonatal			
Infection urinaire pendant la grossesse	48 (15.9)	22 (7.3)	0.001
Streptocoque B vaginal après le 1 <sup>er</sup> trimestre si recherché	48/213 (22.5)	32/294 (10.9)	<0.001
RPM ≥ 12h avant l'accouchement	145 (47.9)	62 (20.5)	<0.001
Signes anténataux de chorioamniotite*	31 (10.3)	4 (1.3)	<0.001
Naissance par césarienne	28 (9.2)	48 (15.8)	0.016
Décès néonatal dans les 48 heures	5 (1.7)	0	NA

Les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage) sauf indication contraire.

Abréviations : DS, déviation standard ; IMC, indice de masse corporelle ; RPM, rupture prématurée des membranes ; NA, non applicable.

**Tableau 2 :** Comparaison des flores vaginales, présentées pour chaque bactérie comme le nombre d'échantillons positifs, selon l'âge gestationnel à l'accouchement

<sup>\*</sup> Au moins deux signes parmi les suivants : fièvre maternelle > 38°C, métrorragies avant le travail, écoulement vaginal purulent ou nauséabond, tachycardie maternelle > 100, tachycardie fœtale > 160, CRP maternelle □ 15 mg/L, leucocytes maternels □ 15 000 / mm3

	Prématurité spontanée 22-36 <sup>+6</sup>	Naissance à terme ≥ 37 SA	р	р
	(n=303)	(n=303)	۲	Ajusté*
Score de Nugent (médiane [IQR])	1 [0 – 3]	1 [0 – 4]	0.25	
0-3 (normale)	230 (80.1)	216 (74.5)		
4-6 (intermédiaire)	29 (10.1)	44 (15.2)		
7-10 (vaginose)	28 (9.8)	30 (10.3)		
Atopobium vaginae	75 (25.8)	81 (26.7)	0.58	
Gardnerella vaginalis	123 (40.6)	130 (42.9)	0.57	
Bacteroides fragilis	2 (0.7)	1 (0.3)	NA	
BVAB2	27 (8.9)	29 (9.6)	0.78	
Megasphera 1	30 (9.9)	33 (10.9)	0.69	
Megasphera 2	3 (1.0)	4 (1.3)	NA	
Prevotella bivia	150 (49.5)	162 (53.5)	0.33	
Mycoplasma hominis	22 (7.3)	10 (3.3)	0.029	0.034
Mobiluncus curtisii	15 (5.0)	10 (3.3)	0.31	
Mobiluncus mulieris	2 (0.7)	0	NA	
Ureaplasma urealyticum	133 (43.9)	103 (34.0)	0.013	0.013
Lactobacillus crispatus	180 (59.4)	170 (56.1)	0.41	
Lactobacillus jensenii	126 (41.6)	117 (38.6)	0.46	
Lactobacillus gasseri	117 (38.6)	127 (41.9)	0.41	

Les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage) sauf indication contraire.

Abréviations : IQR, intervalle interquartiles ; NA, non applicable.

**Tableau 3 :** Comparaison du nombre de log copies détectées pour chaque bactérie, quand l'échantillon était positif, selon l'âge gestationnel à l'accouchement

	urité spontanée 22-36 <sup>+6</sup>		Naissance à terme ≥ 37 SA		р
		(n=303)		(n=303)	
	N	Valeur	N	Valeur	
Atopobium vaginae	75	4.51 [2.75 – 6.51]	81	3.99 [3.02 – 6.75]	0.69
Gardnerella vaginalis	123	4.48 [3.08 – 6.08]	130	4.70 [3.29 – 6.55]	0.31
Bacteroides fragilis	2	2.36 – 3.15	1	2.38	NA
BVAB2	27	4.18 [2.71 – 6.81]	29	4.02 [2.66 – 7.13]	0.95
Megasphera 1	30	6.29 [2.45 – 7.30]	33	6.68 [2.81 – 7.54]	0.15
Megasphera 2	3	4.48 [2.90 – 6.72]	4	4.55 [3.16 – 5.67]	NA
Prevotella bivia	150	3.54 [2.89 – 4.16]	162	3.60 [3.02 – 4.30]	0.83
Mycoplasma hominis	22	4.40 [3.75 – 5.10]	10	4.38 [3.24 – 5.27]	0.86
Mobiluncus curtisii	15	4.23 [2.43 – 5.00]	10	4.88 [3.51 – 5.50]	0.17
Mobiluncus mulieris	2	5.95 – 7.13	0	-	NA
Ureaplasma urealyticum	133	3.84 [3.15 – 4.41]	103	3.75 [3.12 – 4.27]	0.49
Lactobacillus crispatus	180	6.63 [3.78 – 7.10]	170	6.98 [6.34 – 7.26]	<0.001
Lactobacillus jensenii	126	5.69 [4.11 – 6.51]	117	5.71 [5.17 – 6.40]	0.55
Lactobacillus gasseri	117	4.35 [3.25 – 5.79]	127	4.94 [3.88 – 5.87]	0.082
Lactobacillus iners	213	6.02 [3.91 – 6.90]	184	6.10 [3.65 – 7.09]	0.37

<sup>\*</sup> P-valeur ajustée sur le statut tabagique.

Les valeurs sont présentées en médiane [IQR].

Abréviations : IQR, intervalle interquartiles ; NA, non applicable.

**Tableau 4 :** Comparaison des flores vaginales, présentées pour chaque bactérie comme le nombre d'échantillons positifs, selon l'âge gestationnel à l'accouchement chez les accouchements prématurés spontanés

	Prématurité spontanée 22-27 SA (n=12)	Prématurité spontanée 28-32 SA (n=29)	Prématurité spontanée 33-36 SA (n=262)	р
Atopobium vaginae	4 (33.3)	7 (24.1)	64 (24.4)	0.70
Gardnerella vaginalis	6 (50.0)	13 (44.8)	104 (39.7)	0.40
Bacteroides fragilis	0	0	2 (0.8)	NA
BVAB2	1 (8.3)	2 (6.9)	24 (9.2)	0.71
Megasphera 1	3 (25.0)	2 (6.9)	25 (9.5)	0.47
Megasphera 2	1 (8.3)	1 (3.5)	1 (0.4)	NA
Prevotella bivia	8 (66.7)	9 (31.0)	133 (50.8)	0.36
Mycoplasma hominis	0	2 (6.9)	20 (7.6)	0.53
Mobiluncus curtisii	1 (8.3)	1 (3.5)	13 (5.0)	0.97
Mobiluncus mulieris	0	0	2 (0.8)	NA
Ureaplasma urealyticum	7 (58.3)	14 (48.3)	112 (42.8)	0.43
Lactobacillus crispatus	6 (50.0)	17 (58.6)	157 (59.9)	0.53
Lactobacillus jensenii	6 (50.0)	13 (44.8)	107 (40.8)	0.70
Lactobacillus gasseri	5 (41.7)	10 (34.5)	102 (38.9)	0.82
Lactobacillus iners	8 (66.7)	21 (72.4)	184 (70.2)	0.94

Les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage).

Abréviations : NA, non applicable.

### DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons retrouvé une association statistiquement significative entre la présence, dans la flore vaginale du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse, de *Mycoplasme hominis* (*p*=0.034), *d'Ureaplasma urealyticum* (*p*=0.013), de

Lactobacillus iners (p=0.014) et la survenue d'un accouchement prématuré spontané. Cette association a été retrouvée en ajustant sur le statut tabagique qui est un facteur confondant dans notre étude puisque impliqué dans la naissance prématurée (41) (56).

Parallèlement, l'existence d'une chorioamniotite clinique a été retrouvée fortement associée aux accouchements prématurés (p<0.001). Le contexte infectieux de la naissance prématurée dans notre cohorte est ainsi objectivé et nous retrouvons dans nos résultats deux des micro-organismes vaginaux les plus fréquemment mis en évidence en cas de chorioamniotite. En effet, dans la littérature, les microorganismes les plus fréquemment retrouvés dans le liquide amniotique (LA) des patientes présentant une rupture prématurée des membranes ainsi que dans celui des patientes accouchant avant terme avec membranes intactes et présentant une chorioamniotite sont les espèces de mycoplasmes Ureaplasma urealyticum et Mycoplasma hominis (36) (57) (58). Plusieurs études ont démontré que la colonisation précoce du LA par U. urealyticum par ascension intra-utérine était associée à un risque accru d'accouchement prématuré. La présence de ce mycoplasme dès la vingtième semaine de grossesse pourrait provoquer une infection infraclinique chronique qui jouerait un rôle dans la survenue d'une naissance prématurée (59) (60). Nos résultats suggèrent que ces micro-organismes pourraient être des agents pathogènes sous-estimés de la grossesse.

Nous identifions également une association très significative entre le portage vaginal du Streptocoque du groupe B (SGB) dépisté après le 1er trimestre et la prématurité (p<0.001). De précédentes études avaient déjà suggéré que la colonisation vaginale par le SGB pendant la grossesse pouvait constituer un facteur de risque de

l'accouchement prématuré (61) (62) (63). Ainsi, dans une étude prospective portant sur 2846 naissances uniques, Feikin et al rapportaient une fréquence plus élevée de colonisations chez les femmes ayant accouché prématurément (14 %) que chez celles ayant accouché à terme (7 %), après ajustement sur des facteurs de risque d'accouchement prématuré (64). Les stratégies de prévention actuelles (basées sur la prophylaxie antibiotique per-partum) apparaissent trop tardives pour prévenir les mécanismes de la naissance prématurée associée à la colonisation précoce par le SGB.

Conformément aux études les plus récentes (42) (65), nous ne retrouvons pas de lien entre la survenue d'un accouchement prématuré spontané et l'existence d'une vaginose bactérienne (VB) définie par un score de Nugent supérieur ou égal à 7. Ce résultat est cohérent avec l'implication possible d'U.urealyticum et M.hominis dans la survenue d'un accouchement prématuré. En effet, ces deux mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi et donc indétectables par coloration de Gram. Ces bactéries ne participent donc pas à l'établissement du score de Nugent et à la définition de la vaginose bactérienne qui en découle - Raréfaction des lactobacilles et présence de Gardnerella et/ou Mobiluncus. Cette définition de la VB est d'ailleurs remise en cause par de nombreux auteurs (66) (67) (68) (69). L'utilisation des techniques de biologie moléculaires a permis de faire évoluer la définition de la vaginose bactérienne, certains auteurs incluant même *Ureaplasma* ou *Mycoplasma* comme marqueurs de VB (70) (71). En outre, les mycoplasmes ne sont pas sensibles aux traitements antibiotiques utilisés dans le traitement de la vaginose, principalement le métronidazole et la clindamycine (72) . Ceci corrobore l'échec des essais thérapeutiques réalisés jusqu'ici qui cherchaient à diminuer le risque d'accouchement prématuré par le traitement d'une VB dépistée par Nugent. Notre étude questionne donc sur la pertinence de l'utilisation du score de Nugent pour la détection de la vaginose.

Nous retrouvons également un lien entre *Lactobacillus iners* et la survenue d'un accouchement prématuré (p=0.014). Dans la littérature récente, ce lactobacille est suspecté d'être un marqueur du déséquilibre microbien conduisant à la VB (73).

Cette étude a donc permis de réexaminer les relations qui existe entre le portage de certains micro-organismes de la cavité vaginale et le risque de prématurité. Nous retrouvons des résultats en adéquation avec la littérature et notre étude présente de nombreux points forts. En effet, elle est l'une des plus larges à avoir étudié le lien entre flore vaginale et prématurité. Le nombre important d'échantillons à analyser ainsi que le caractère fastidieux de la culture de certaines des bactéries étudiées nous ont amené à choisir une technique de biologie moléculaire innovante (qPCR OpenArray) pour l'étude. En comparaison à la microscopie et à la culture bactérienne, les méthodes moléculaires telles que la PCR fournissent des résultats moins dépendants de l'observateur et une appréciation plus directe et détaillée de la quantité de certaines espèces dans un échantillon. Cette technique de PCR en temps réel bénéficie d'une haute reproductibilité entre les sets et de nombreux contrôles qualité permettent de s'assurer de l'intégrité des échantillons. De plus, les faibles volumes employés par la technique (33nL) nous permettent d'envisager d'autres expérimentations avec les mêmes échantillons cliniques. Enfin, les prélèvements ont été réalisés de manière prospective en tout début de grossesse, en amont des mécanismes amenant à la

prématurité. Une éventuelle antibiothérapie prophylactique pourrait être particulièrement profitable à ce moment de la grossesse.

Bien que notre étude ait été construite de manière prospective, elle connaît les limites liées au caractère rétrospectif de la collection de données, avec un taux élevé de 43.6 % de données non utilisables. Ce taux élevé est en rapport avec les critères d'inclusion stricts définis préalablement à l'étude, notamment du fait de l'exclusion des femmes dont le témoin ou le cas n'était pas utilisable (près de la moitié étaient inutilisables du fait de l'absence de données chez leur cas ou leur témoin associé). En outre, un pourcentage conséquent (11.5%) de prélèvements vaginaux s'est révélé inexploitable au moment de l'analyse (absence de matériel biologique dans le prélèvement ou nature du prélèvement non conforme). Cette limitation du nombre de patientes incluses a pu diminuer la puissance de nos comparaisons.

Finalement, la colonisation vaginale précoce puis l'ascension intra-utérine d'U.urealyticum et M.hominis apparaissent comme des causes très probables d'infection intra-amniotique menant à l'accouchement prématuré. Les mycoplasmes sont des germes peu pathogènes pouvant faire partie de la flore vaginale normale mais également de la vaginose bactérienne (33). Ces bactéries sont en revanche capables d'induire d'importantes réactions inflammatoires par le biais des Toll-Like Receptors (78). Nos résultats nous amènent à envisager de futures recherches sur le rôle des mycoplasmes dans l'issue défavorable de la grossesse par d'autres moyens statistiques et des questions plus spécifiques sur le moment et la période de latence de l'infection ou les facteurs de l'hôte favorisant l'arrivée des bactéries au niveau de l'utérus. Le rôle propre de la colonisation précoce à Streptocoque B devrait lui aussi être exploré par une méthode de PCR en temps réel. L'ensemble de ces axes de réflexion pourraient aboutir sur de nouvelles possibilités d'interventions thérapeutiques pour prévenir la prématurité.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. The lancet. 2008;371(9606):75–84.
- 2. Blondel B, Supernant K, Du Mazaubrun C, Breart G, others. Enquête nationale périnatale 2003: situation en 2003 et évolution depuis 1998. 2003 [cité 15 mai 2017]; Disponible sur: http://lara.inist.fr/handle/2332/1299
- 3. Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. Lancet. 4 févr 2012;379(9814):445-52.
- 4. Moore E, Blatt K, Chen A, Van Hook J, Defranco EA. Relationship of trimester specific smoking patterns and risk of preterm birth. Am J Obstet Gynecol. juill 2016;215(1):109.e1-109.e6.
- 5. Yang J, Baer RJ, Berghella V, Chambers C, Chung P, Coker T, et al. Recurrence of Preterm Birth and Early Term Birth. Obstet Gynecol. août 2016;128(2):364-72.
- 6. Lepargneur J-P, Rousseau V. Rôle protecteur de la flore de Doderleïn. /data/revues/03682315/00310005/485/ [Internet]. 9 mars 2008 [cité 5 juin 2019]; Disponible sur: https://www.em-consulte.com/en/article/114512
- 7. Quentin R. Écologie bactérienne vaginale : nature, exploration et prise en charge des déséquilibres. In Paris; 2006.
- 8. Lepargneur J-P. *Lactobacillus crispatus*, biomarqueur de l'écosystème vaginal sain. Ann Biol Clin (Paris). 1 juill 2016;74(4):421-7.
- 9. Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. Dan Med J. 2014;61(4):134830.
- 10. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae indicates an inverse relationship between L. gasseri and L. iners. BMC Microbiol. 2007;7(1):115.
- 11. Brabant G. Vaginose bactérienne et prématurité spontanée. J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod. déc 2016;45(10):1247-60.
- 12. Ma B, Forney LJ, Ravel J. The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. Annu Rev Microbiol. 2012;66:371-89.
- 13. Petrova MI, Reid G, Vaneechoutte M, Lebeer S. Lactobacillus iners: Friend or Foe? Trends Microbiol. mars 2017;25(3):182-91.

- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 mars 2011;108(Suppl 1):4680-7.
- 15. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UME, Zhong X, et al. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. Sci Transl Med. 2 mai 2012;4(132):132ra52-132ra52.
- 16. Delaney ML, Onderdonk AB. Nugent score related to vaginal culture in pregnant women. Obstet Gynecol. juill 2001;98(1):79-84.
- 17. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. Clin Microbiol Rev. avr 2016;29(2):223-38.
- 18. Cherpes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. Sex Transm Dis. janv 2008;35(1):78-83.
- 19. Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. Am J Obstet Gynecol. déc 2013;209(6):505-23.
- 20. Desseauve D, Chantrel J, Fruchart A, Khoshnood B, Brabant G, Ancel PY, et al. Prevalence and risk factors of bacterial vaginosis during the first trimester of pregnancy in a large French population-based study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1 juill 2012;163(1):30-4.
- 21. Verstraelen H, Verhelst R, Vaneechoutte M, Temmerman M. The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. BMC Infect Dis. 30 mars 2010;10:81.
- 22. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med. 1983;74(1):14–22.
- 23. Guise J-M, Mahon SM, Aickin M, Helfand M, Peipert JF, Westhoff C. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy22. Am J Prev Med. 1 avr 2001;20(3):62-72.
- 24. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol. févr 1991;29(2):297-301.
- 25. Livengood CH. Bacterial Vaginosis: An Overview for 2009. Rev Obstet Gynecol. 2009;2(1):28-37.
- 26. Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. J Clin Microbiol. juin 1989;27(6):1266-71.

- 27. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. N Engl J Med. 18 mai 2000;342(20):1500-7.
- 28. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, et al. Diversity of the Vaginal Microbiome Correlates With Preterm Birth. Reprod Sci. janv 2014;21(1):32-40.
- 29. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: One syndrome, many causes. Science. 15 août 2014;345(6198):760-5.
- 30. Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. BJOG Int J Obstet Gynaecol. 1 déc 2006;113:17-42.
- 31. Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. Semin Fetal Neonatal Med. févr 2012;17(1):12-9.
- 32. Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol D, et al. Bacterial vaginosis: prevalence and predictive value for premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 10 juin 2003;108(2):146-51.
- 33. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look. Infect Dis Obstet Gynecol [Internet]. 2010 [cité 27 août 2019];2010.
- 34. GOLDENBERG RL, ANDREWS WW, GOEPFERT AR, FAYE-PETERSEN O, CLIVER SP, CARLO WA, et al. The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical Cord Blood Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis Cultures in Very Preterm Newborns. Am J Obstet Gynecol. janv 2008;198(1):43.e1-43.e5.
- 35. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. Semin Reprod Med. janv 2007;25(01):021-39.
- 36. Romero R, Gómez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Kim JC, Kim YM. The role of infection in preterm labour and delivery. Paediatr Perinat Epidemiol. 2001;15(s2):41-56.
- 37. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: A meta-analysis. Am J Obstet Gynecol. juill 2003;189(1):139-47.
- 38. Donati L, Vico AD, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Arch Gynecol Obstet. 1 avr 2010;281(4):589-600.

- 39. Klebanoff MA, Hillier SL, Nugent RP, MacPherson CA, Hauth JC, Carey JC, et al. Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation? Am J Obstet Gynecol. févr 2005;192(2):470-7.
- 40. Leitich H, Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. juin 2007;21(3):375-90.
- 41. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, et al. Association between Bacterial Vaginosis and Preterm Delivery of a Low-BirthWeight Infant.
- 42. Thorsen P, Vogel I, Olsen J, Jeune B, Westergaard JG, Jacobsson B, et al. Bacterial vaginosis in early pregnancy is associated with low birth weight and small for gestational age, but not with spontaneous preterm birth: A populationbased study on Danish women. J Matern Fetal Neonatal Med. 1 janv 2006;19(1):1-7.
- 43. Kurki T, Sivonen A, Renkonen OV, Savia E, Ylikorkala O. Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. Obstet Gynecol. août 1992;80(2):173-7.
- 44. Duff P, Lee ML, Hillier SL, Herd LM, Krohn MA, Eschenbach DA. Amoxicillin treatment of bacterial vaginosis during pregnancy. Obstet Gynecol. mars 1991;77(3):431-5.
- 45. Kekki M, Kurki T, Pelkonen J, Kurkinen-Räty M, Cacciatore B, Paavonen J. Vaginal clindamycin in preventing preterm birth and peripartal infections in asymptomatic women with bacterial vaginosis: a randomized, controlled trial. Obstet Gynecol. mai 2001;97(5 Pt 1):643-8.
- 46. Hauth JC, Goldenberg RL, Andrews WW, DuBard MB, Copper RL. Reduced Incidence of Preterm Delivery with Metronidazole and Erythromycin in Women with Bacterial Vaginosis
- 47. Morales WJ, Schorr S, Albritton J. Effect of metronidazole in patients with preterm birth in preceding pregnancy and bacterial vaginosis: a placebocontrolled, double-blind study. Am J Obstet Gynecol. août 1994;171(2):345-7; discussion 348-349.
- 48. Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. The Lancet. 22 mars 2003;361(9362):983-8.
- 49. ANAES.Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. Paris : Agence d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES), 2001 : 135 pages.

- 50. Brocklehurst P, Gordon A, Heatley E, Milan SJ. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. Cochrane Database Syst Rev [
- 51. Lamont RF, Nhan-Chang C-L, Sobel JD, Workowski K, Conde-Agudelo A, Romero R. Treatment of abnormal vaginal flora in early pregnancy with clindamycin for the prevention of spontaneous preterm birth: a systematic review and metaanalysis. Am J Obstet Gynecol. sept 2011;205(3):177-90.
- 52. Subtil D, Brabant G, Tilloy E, Devos P, Canis F, Fruchart A, et al. Early clindamycin for bacterial vaginosis in pregnancy (PREMEVA): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. The Lancet. 17 nov 2018;392(10160):2171-9.
- 53. Paramel Jayaprakash T, Wagner EC, van Schalkwyk J, Albert AYK, Hill JE, Money DM, et al. High Diversity and Variability in the Vaginal Microbiome in Women following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A Prospective Cohort Study. Ciccozzi M, éditeur. PLOS ONE. 18 nov 2016;11(11):e0166794.
- 54. Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. J Clin Microbiol. janv 2009;47(1):38-47.
- 55. Yoon BH, Romero R, Lim J-H, Shim S-S, Hong J-S, Shim J-Y, et al. The clinical significance of detecting Ureaplasma urealyticum by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. Am J Obstet Gynecol. 1 oct 2003;189(4):919-24.
- 56. Ion R, Bernal AL. Smoking and Preterm Birth. Reprod Sci. 1 août 2015;22(8):918-26.
- 57. Pararas MV, Skevaki CL, Kafetzis DA. Preterm birth due to maternal infection: causative pathogens and modes of prevention. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1 sept 2006;25(9):562-9.
- 58. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A Case—Control Study of Chorioamnionic Infection and Histologic Chorioamnionitis in Prematurity. N Engl J Med. 13 oct 1988;319(15):972-8.
- 59. Horowitz S, Mazor M, Romero R, Horowitz J, Glezerman M. Infection of the amniotic cavity with Ureaplasma urealyticum in the midtrimester of pregnancy. J Reprod Med. mai 1995;40(5):375-9.
- 60. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, Thomson Jr RB. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of Ureaplasma urealyticum. Prenat Diagn. 1 févr 1992;12(2):111-7.

- 61. Bianchi-Jassir F, Seale AC, Kohli-Lynch M, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, et al. Preterm Birth Associated With Group B Streptococcus Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clin Infect Dis. 6 nov 2017;65(suppl 2):S133-42.
- 62. Allen U, Nimrod C, MacDonald N, Toye B, Stephens D, Marchessault V. Relationship between antenatal group B streptococcal vaginal colonization and premature labour. Paediatr Child Health. oct 1999;4(7):465-9.
- 63. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, Eschenbach DA, Blackwelder WC, Lou Y, et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. VIP Study Group. Am J Obstet Gynecol. avr 1996;174(4):1354-60.
- 64. Feikin DR, Thorsen P, Zywicki S, Arpi M, Westergaard JG, Schuchat A. Association between colonization with group B streptococci during pregnancy and preterm delivery among Danish women. Am J Obstet Gynecol. 1 févr 2001;184(3):427-33.
- 65. Bothuyne-Queste É, Hannebicque-Montaigne K, Canis F, Noulard M-N, Plennevaux J-L, Tilloy E, et al. La vaginose bactérienne est-elle facteur de risque de prématurité? Étude d'une cohorte de 1336 patientes au centre hospitalier d'Arras.
- 66. Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA, et al. Development and Validation of a Semiquantitative, Multitarget PCR Assay for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. J Clin Microbiol. juill 2012;50(7):2321-9.
- 67. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for Detection of Vaginal Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. J Clin Microbiol. oct 2007;45(10):3270-6.
- 68. Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, et al. Development and Validation of a Highly Accurate Quantitative Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. J Clin Microbiol. avr 2016;54(4):1017-24.
- 69. Kusters JG, Reuland EA, Bouter S, Koenig P, Dorigo-Zetsma JW. A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. sept 2015;34(9):1779-85.
- 70. Patel MA, Nyirjesy P. Role of Mycoplasma and Ureaplasma Species in Female Lower Genital Tract Infections. Curr Infect Dis Rep. 1 nov 2010;12(6):417-22.
- 71. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H2O2-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. juin 1993;16 Suppl 4:S273281.

- 72. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Antimicrobial susceptibility patterns of Ureaplasma species and Mycoplasma hominis in pregnant women. BMC Infect Dis. 28 mars 2014;14:171.
- 73. Kindinger LM, Bennett PR, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, Cacciatore S, et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. Microbiome. 2017;5:6.
- 74. Ferris MJ, Norori J, Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH. Cultivation-Independent Analysis of Changes in Bacterial Vaginosis Flora Following Metronidazole Treatment. J Clin Microbiol. mars 2007;45(3):1016-8.
- 75. Jakobsson T, Forsum U. Lactobacillus iners: a Marker of Changes in the Vaginal Flora? J Clin Microbiol. sept 2007;45(9):3145.
- 76. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, Edwards DJ, Girerd PH, Parikh HI, et al. The vaginal microbiome and preterm birth. Nat Med. juin 2019;25(6):1012-21.
- 77. Brown RG, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Lehne B, Kindinger LM, et al. Vaginal dysbiosis increases risk of preterm fetal membrane rupture, neonatal sepsis and is exacerbated by erythromycin. BMC Med
- 78. Petit E, Abergel A, Dedet B, Subtil D. Prématurité et infection : état des connaissances. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.février 2012; 41(1) : 14-25.

Annexe 1 : Liste des 14 centres partenaires de l'étude et ayant signé convention

Maternité du CH d'Armentières

Maternité du CH d'Arras

Maternité des Bonnettes, Arras

Maternité du CH de Béthune

Clinique Sainte Marie, Cambrai

Maternité du CH de Denain

Clinique Saint Amé, Douai

Maternité du CH de Lens

Maternité Jeanne de Flandre, Lille

Maternité Saint Vincent de Paul, Lille

Maternité de Beaumont, Roubaix

Maternité du CH de Seclin

Maternité du CH Valenciennes

Maternité HPVA, Villeneuve d'Ascq

Annexe 2\_: Fiche de Dépistage PREMEVA 2

### **PREMEVA 2**



### Etude du risque de prématurité selon l'équilibre de la flore bactérienne Vaginale

Coller ici étiquette Labo

Coller ici étiquette code barre PREMEVA

### **FICHE de DEPISTAGE**

Age ≥ 18 ans  La patiente présente-elle	Cachet laboratoire		
Merci à la patiente de compléter tous les renseignements la	concernant		
Nom de Jeune Fille			
Nom d'épouse   _ _ _ _  Date de Naissand	ce   _		
Adresse			
N° de téléphone                           ou			
Niveau d'études ☐ Collège (1) ☐ Lycée (2) ☐	Etudes supérieures (≥ Bac) (3)		
Tabagisme ( $\geq 1/\text{jour}$ ) $\square$ OUI (1) $\square$ NON (2)			
Avez-vous déjà accouché ?			
Nombre d'enfants <b>nés prématurés</b> (entre 25 et 37 SA ou 5 et 8 mois de grossesse)			
Dans le mois précédant ce test, avez- vous pris un traitement antibiotique?	□ OUI (1) □ NON (2)		
Date de vos dernières règles     _			
Date de début de la grossesse   _			
Dans quelle maternité souhaitez-vous accoucher ?			
VOTRE MEDECIN PRESCRIPTEUR/TRAITANT			
Nom Prénom			
Adresse			
Téléphone			
Cadre réservé au laboratoire			
Date du dépistage  _          Assentiment	signé OUI    (1)		
Heure de prélèvement   _     Heure de con	gélation   _		
Filament mycélien	□ OUI (1) □ NON (2)		
Score NUGENT = L=   + G=   +M=   =	Non réalisable		

Faxer ce document à l'Unité de Recherche Clinique au 03.20.44.69.95

Annexe 3\_: Accord Comité de Protection des Personnes

### Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV

Président : J.P. JOUET

Vice-Président: F. ASKEVIS-LEHERPEUX

Secrétaire : S. DUHEM Trésorier : Y. VENDEL Lille, le 5 janvier 2012,

Monsieur Régis FIEVE

Délégation à la Recherche Médicale

Administration Générale

CHRU de Lille

Membres titulaires :

V. BARON V. BARON
R. BEUSCART
S. COSTA
A. De BOUVET
X. LABBEE
R. MATIS

P. ODOU WILLIATTE-PELLITTERI

G. MARCHAL N. MESSAADI Monsieur le Professeur D. SUBTIL

Hôpital Jeanne De Flandre Pôle Femme, mère, nouveau-né

CHRU de Lille

#### <u>Membres suppléants</u>:

M. DE MEDEIROS M FOULARD A. LECOCO P. MACIAG N. PENEL C. THERY F. VASSEUR A-F. GERME

DANICOURT-BARRIER BONTEMPS BARINCOU

Référence à rappeler dans toute correspondance : CPP 11/70

Intitulé du projet : "Etude du risque de prématurité selon l'équilibre de la flore

bactérienne vaginale". Promoteur: CHRU de Lille

Investigateur principal: Professeur Damien SUBTIL

Référence des documents étudiés:

Courrier du promoteur daté du 10/10/11 Protocole version 3 daté du 04/10/11

Résumé du protocole version non daté Document additionnel daté du 20/10/11

Note d'information et formulaire de consentement version 3 datés du 04/10/11

CV des investigateurs

N° Enregistrement: 2011 A01254 37

Date de la réunion : mardi 20 décembre 2011

Membres présents :

Mme ASKEVIS-LEHERPEUX - Représentant des Psychologues

Mme BARON - Représentant des travailleurs sociaux Mme DE MEDEIROS - Représentant des Infirmiers Mr S. DUHEM - Représentant des Psychologues

Mr M. FOULARD – Représentant en matière d'Ethique Mme A-F. GERME - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale Mr J.P. JOUET - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale

Mme LECOCQ - Représentant en matière juridique rétariat : Mr MARCHAL - Représentant des Associations rice de Pharmacologie alté de Médecine Mr MACIAG - Représentant des Associations

Mme VENDEL - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale Recherche Mr VASSEUR - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale ice de Verdum 15 LILLE Cedex

Mr LABBEE - Représentant en matière juridique

Mme DANICOURT - Représentant des pharmaciens hospitaliers Mme WILLIATTE-PELLITTERI - Représentant en matière juridique 03 20 44 68 63

il : oppnordouestiv @univ-lille2.fr Mr BARINCOU - Représentant en matière juridique

Monsieur le Directeur, Cher Confrère,

Le Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV, lors de sa réunion du mardi 20 décembre 2011, a pris connaissance des documents concernant l'étude citée en référence.

### Le Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest IV émet un avis favorable à la menée de l'étude.

Quelques remarques non bloquantes et non suspensives ont été faites :

- Au point VI du protocole (page 20 et 21) il est dit que les prélèvements seront détruits au 31 décembre 2013. Il est peut être imprudent d'afficher une date aussi précise qui dépend très vraisemblablement de la date de début de l'étude (et qui faisait présager accessoirement d'un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV...).
- En ce qui concerne la dénomination du type de l'étude, les spécialistes du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest ont estimé qu'il s'agissait plutôt d'une étude « cas-témoins nichée dans une cohorte » plutôt que d'une étude rétrospective comme annoncée.

Je vous remercie de me faire part des réponses à ces remarques non bloquantes et non suspensives.

Cette étude est conforme aux articles L1121-1 et L1123-7 du code de la santé publique définissant les conditions de validité de la recherche.

Cet avis a été rendu sans que les membres éventuellement concernés par l'étude aient pris part au vote.

Je vous prie de croire, Monsieur le Directeur, Cher Confrère, à l'expression de mes meilleures salutations.

PP Nord Ouest IV

CPP Nord Ouest IV

Service de pharmacologie Faculté de Médecine 1 place de Verdun 59045 Lille Cedex

Université de Lille FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE

### MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES (tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)

Année Universitaire 2018 /2019

Nom : LOQUET **Prénom :** Aurore

Titre du mémoire : LA PREMATURITE EST-ELLE LIEE A DES ANOMALIES DE LA

FLORE VAGINALE? L'ETUDE PREMEVA 2

Mots-clés: Accouchement prématuré <37 SA, flore vaginale, Etude cas témoins

Résumé: Alors que la vaginose bactérienne est décrite pour être associée à une augmentation du risque de prématurité, ce lien est remis en cause du fait de l'échec de politique de corrections de la vaginose bactérienne par les traitements antibiotiques (Etude PREMEVA1). Dans le cadre de l'étude PREMEVA 2, notre travail s'est attaché à réexaminer la relation entre la composition de la flore vaginale au premier trimestre de la grossesse et la survenue d'un accouchement prématurité entre 22 et 36 SA. PREMEVA 2 est une étude cas-témoins multicentrique nichée dans une cohorte de 12820 patientes prélevées au 1er trimestre de la grossesse. Au niveau de la flore vaginale des cas et des témoins, 15 microorganismes ont été recherchés et quantifiés par qPCR open array□. Parmi les 11 332 patientes éligibles, 562 ont présenté un accouchement prématuré spontané (5.0 %). Après exclusion de 259 dossiers, 303 accouchements prématurés spontanés entre 22 et 36 SA ont été comparés à 303 accouchements à terme. Par rapport aux accouchements à terme, les patientes ayant accouché prématurément étaient plus souvent fumeuses (23.8 vs 17.5%, p=0.061). Au cours de la grossesse, elles avaient présenté plus fréquemment un portage vaginal de streptocoque B (15.9 vs 7.3%, p<0.001). La prévalence de la vaginose bactérienne détectée par le score de Nugent était similaire entre les deux groupes (9.8 vs 10.3 % p=0.168). Au niveau de la flore vaginale, l'analyse qualitative a montré que 3 bactéries étaient significativement plus fréquentes dans les prélèvements vaginaux des patientes cas: Mycoplasma hominis (7.3% vs 3.3%, p=0.034), Ureaplasma urealyticum (43.9% vs 34.0 %, p=0.013) et Lactobacillus iners

(70.3% vs 60.7%, p = 0.014). L'analyse quantitative a montré que *Lactobacillus crispatus* était plus abondant, en nombre de log copies chez les patientes témoins (6.98 log de copies vs 6.63, p <0.001). La comparaison des flores vaginales n'a pas montré de différences significatives selon le stade de prématurité, chez les accouchements prématurés spontanés.

#### Président :

Professeur Delphine ALLORGE : PU-PH, CHU Lille, Faculté de pharmacie de Lille

#### Assesseurs:

Professeur Damien SUBTIL : PU-PH, CHU Lille, Faculté de médecine de Lille

Docteur Etienne BROCHOT : MCU-PH, CHU Amiens, Faculté de pharmacie Amiens

Docteur Rodrigue DESSEIN : MCU-PH, CHU Lille, Faculté de médecine de Lille Docteur Anne GOFFARD : MCU-PH, CHU Lille, Faculté de pharmacie de Lille

Docteur Constance BAILLIE : PH, Centre Hospitalier de Valenciennes