



Etude PREMEVA2

***Etude du risque de PREMaturité selon l'équilibre
la flore bactérienne VAginale.***



**Projet des cliniques, maternités
et laboratoires d'analyses
médicales publics et privés
de la région Nord Pas de Calais**

Avec la collaboration :

- de l'Association des Biologistes des Régions Nord Picardie
- du Cercle des Hôpitaux Généraux Nord Pas de Calais Picardie
- de l'Université d'Etat (Lille 2) et de l'Université Catholique (GHICL) de Lille

- Promoteur : CHRU de Lille -

Sommaire

Résumé	3
Avant-propos	5
1 Position du problème	6
1.1 La prématurité comme problème de santé	6
1.1.1 Fréquence et conséquence de la prématurité	6
1.1.2 Coût de la prématurité	6
1.2 Prématurité : liens avec la vaginose bactérienne	7
1.2.1 Prématurité et infection	7
1.2.2 Le type de germes retrouvés, leur origine et le mécanisme envisagé	8
1.2.3 Les micro-organismes vaginaux, leur rapport avec la prématurité	9
1.2.4 Risque de prématurité d'origine infectieuse : possibilités de traitement et recommandations	11
1.2.5 Biologie moléculaire : progrès dans l'identification des micro-organismes	13
1.3 L'étude PREMEVA1 comme essentiel « point de départ »	15
2 Description de l'étude	19
2.1 But	19
2.2 Population et méthodes	19
2.2.1 Le prélèvement au premier trimestre de la grossesse	19
2.2.2 Rôle de l'Association des Biologistes Nord Picardie (ABRNP)	21
2.2.3 Rôle de l'Unité de Recherche PREMEVA2	22
2.2.4 La détermination des cas et des témoins à l'accouchement	22
2.2.5 Les données recueillies chez les cas et les témoins	24
2.2.6 Stockage et transfert des écouvillons congelés à -20°C	24
2.2.7 Analyse des écouvillons par PCR	25
2.3 Analyse des résultats	26
2.3.1 Détermination du seuil de positivité pour chaque micro-organisme	26
2.3.2 Calcul des risques en analyse univariée puis multivariée	27
2.4 Nombre de sujets nécessaire	28
2.5 Calendrier d'étude	29
2.6 Budget de l'étude	30
2.7 Faisabilité	31
Bibliographie	32

Résumé

1. POSITION DU PROBLEME/RATIONEL

Le Nord Pas de Calais est l'une des régions françaises les plus touchées par la prématurité, principale cause de mortalité et de morbidité périnatales. Ce sont environ 4000 enfants qui sont concernés tous les ans dans notre région. Le risque de séquelles neurologiques à long terme est d'autant plus fréquent que la prématurité est spontanée. Le coût humain et médico-économique est alors considérable.

Les causes de la prématurité spontanée sont mal connues. Le rôle de l'infection y apparaît de plus en plus probable, par ascension de micro-organismes à partir de la cavité vaginale. La détermination des morphotypes bactériens réalisée par score de Nugent à partir d'un étalement des secrétions vaginales montre que les anomalies qualitatives de la flore présentes au premier trimestre de la grossesse sont associées à un doublement du risque de prématurité (vaginose bactérienne).

L'arrivée récente de la PCR quantitative pourrait bouleverser notre compréhension des mécanismes physiopathologiques en présence, ouvrant de nouvelles pistes pour la mise au point de nouveaux marqueurs prédictifs et de nouveaux traitements. Elle permet en effet d'étudier des micro-organismes – anaérobies ou apparentés – difficiles à cultiver par les méthodes conventionnelles, mais pour lesquelles les techniques de quantifications sont maintenant au point. Une étude du rôle spécifique de ces micro-organismes vaginaux pourrait révéler un rôle plus spécifique et plus intense de certains de ces germes sur le risque de prématurité spontanée.

2. OBJECTIF

Mesurer le risque de prématurité spontanée associé à la présence de sept micro-organismes potentiellement impliqués dans la vaginose bactérienne, recherchés par PCR au premier trimestre de la grossesse : *Gardnerella vaginalis*, *Mobilincus curtisii*, *Mobilincus mulieris*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Lactobacillus species*.

3. METHODOLOGIE

Données préexistantes : Depuis avril 2006, toutes les patientes du Nord Pas de Calais se voient proposer un auto-prélèvement vaginal au premier trimestre de la grossesse, pour recherche de vaginose bactérienne par score de Nugent (Etude PREMEVA1 ; PHRC 2008). Cette étude cessera le 31 août 2011.

Modalités de prélèvement pour l'étude PREMEVA2 : Forts de l'expertise acquise au cours de l'étude PREMEVA1, toutes les femmes enceintes de la région Nord Pas de Calais se verront proposer un double auto-prélèvement vaginal avant 14 SA de grossesse, dans le cadre de l'étude PREMEVA2. Après consentement, l'un servira à réaliser un score de Nugent, l'autre sera stocké à -20°C pour PCR.

Population et méthode envisagée : Etude rétrospective « cas-témoins » réalisée dans les 35 maternités de la région Nord Pas de Calais. Les caractéristiques générales, obstétricales et microbiologiques de 500 patientes ayant présenté un accouchement prématuré spontané entre 22 et 37 SA seront comparées aux mêmes données pour 500 patientes témoins ayant accouché dès 37 SA. Les patientes cas et témoins seront appariées sur le lieu d'accouchement, sur l'existence d'un prélèvement vaginal avant 14 SA, ainsi que sur le jour de la naissance.

Analyse : Pour chacun des micro-organismes, une quantification sera obtenue par PCR en temps réel. Une valeur seuil de concentration sera alors retenue en fonction de la meilleure sensibilité à niveau de spécificité donné pour prédire le risque de prématurité spontanée ($\geq 90\%$). Le risque relatif de prématurité propre à chaque micro-organisme sera approché par son odds ratio (OR), après régression logistique du risque de prématurité spontanée sur la présence des différents micro-organismes de la cavité vaginale.

Durée et puissance de l'étude: La participation déjà établie des Laboratoires de Biologie Médicale et des maternités du Nord Pas de Calais devrait permettre l'inclusion de 1000 patientes (cas et témoins) en 12 mois. Elle permettra de mettre en évidence des micro-organismes pour lesquels le risque de prématurité spontanée retenu est au moins doublé ($OR \geq 2.0$).

Aspects réglementaires : Avis du CCP requis. Déclaration CNIL du fichier de données nominatives à réaliser

Avant-propos

Essai randomisé multicentrique prévu pour durer entre 2006 et 2010 (PHRC), l'étude **PREMEVA1** visait à tester l'efficacité de la *clindamycine* pour diminuer la fréquence de la grande prématurité chez des patientes porteuses d'une vaginose bactérienne au premier trimestre de la grossesse.

Les points forts de l'étude

Expérience acquise dans la pratique de l'auto-prélèvement et du dépistage standardisé de la vaginose

Continuité attendue dans la pratique du dépistage

Utilisation de techniques innovantes pour la caractérisation de la flore (PCR), non accessible par des techniques conventionnelles

Réseau pluridisciplinaire de professionnels actifs, avec participation de 95% des laboratoires et 100% des maternités de la région (publiques et privées).

La courbe des inclusions est présentée en page 17 et montre que celles-ci dépasseront les 3000 attendues vers avril 2011. Plus de 80 000 patientes auront alors été dépistées pour l'existence d'une vaginose bactérienne au premier trimestre de la grossesse. Les résultats de l'essai seront disponibles début 2013.

Le projet **PREMEVA2** présenté ici est cette fois une **recherche à visée étiologique** dont le but est de mesurer le **rôle spécifique de micro-organismes vaginaux difficiles à cultiver sur le risque de prématurité**. Si cette recherche de grande envergure est possible, c'est parce que les biologistes et professionnels des maternités de la région Nord Pas de Calais ont montré leur **capacité à travailler ensemble**, dans l'esprit qui a été insufflé par les Programmes Hospitaliers de Recherche Clinique.

Nous aimerions que la dynamique de l'étude PREMEVA1 puisse bénéficier à PREMEVA2, recherche étiologique qui a reçu l'assentiment – et même l'engouement scientifique - des biologistes associés au projet.

L'équipe PREMEVA

1. Position du problème

1.1. La prématurité comme problème de santé

1.1.1 Fréquence et conséquence de la prématurité

Dans les pays développés, la prématurité (naissance avant 37 SA) est la **principale cause de morbidité et de mortalité périnatales**. En France, elle concerne environ 7 % des naissances(1, 2). Les séquelles de cette prématurité sont surtout neurologiques, cognitives, respiratoires et nutritionnelles(3, 4).

La prématurité « provoquée » est celle qui est décidée du fait des risques que la grossesse fait courir à la mère et/ou à l'enfant. A l'inverse, la prématurité « spontanée » est celle qui survient en dehors de toute volonté d'abrégier la grossesse, généralement du fait d'une ouverture spontanée du col utérin ou bien d'une rupture spontanée des membranes. Ce type de prématurité représente un peu plus de la moitié de la prématurité globale (5, 6), mais ce pourcentage atteint 70 ou même 80 % avant 28 SA (7).

Cette prématurité spontanée semble d'autant plus préoccupante qu'elle semble augmenter dans les pays développés (5), que son mécanisme de survenue est mal compris(8) et que les séquelles sévères qui lui sont liées sont 3 à 4 fois plus fréquentes que celles qui sont liées à la prématurité provoquée(9).

1.1.2 Coût de la prématurité

Ces coûts sont élevés, à la fois pour la société et pour les individus. Ils comportent:

- Les dépenses **à court terme** : coûts principalement obstétricaux, de réanimation néonatale, de soins courants de néonatalogie et de puériculture ; ils ont pu être évalués à environ 60 000 € par naissance prématurée(10).



- Les dépenses **à long terme (séquelles)**. A chaque fois que l'apprentissage de l'enfant est compromis, ces coûts deviennent très élevés, qu'il s'agisse d'altérations des fonctions motrices, sensorielles, cognitives ou de plusieurs d'entre elles à la fois. Quand le handicap est si lourd qu'il concerne **la vie entière d'un enfant**, on estime actuellement **ce coût d'origine périnatale entre 4 et 7 millions d'euros** (selon que l'assistance est nécessaire seulement une partie de la journée ou bien en permanence).

1.2 Prématurité : liens avec la vaginose bactérienne

1.2.1 Prématurité et infection

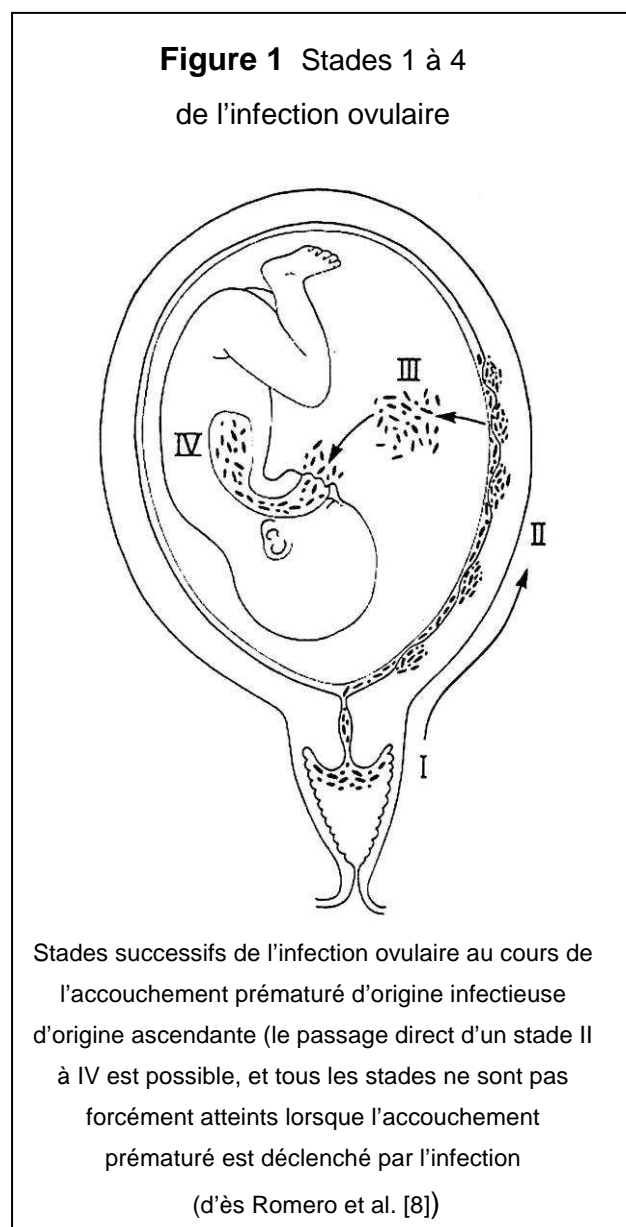
Il existe de nombreux facteurs de risque de prématurité, mais les causes de la prématurité spontanée sont mal connues (en dehors de cas de surdistension utérine) (8). De nombreux travaux et l'expérience accumulée depuis 15 années indiquent qu'environ 40 % des accouchements prématurés **pourraient être liés à une origine infectieuse(5, 8)**. Ce lien est statistiquement d'autant plus fort que l'accouchement survient plus précocement : **une étiologie infectieuse est suspectée dans 60 à 80 % des cas avant 28 SA(7, 11)** mais seulement 10 - 15 % des cas dès 34 SA (12) .

Cette liaison avec l'infection microbienne est d'autant plus préoccupante que les accouchements prématurés **survenus dans un contexte infectieux sont liés à un plus pronostic neurologique et respiratoire trois à cinq fois plus défavorables** que les autres, à long terme(9, 13, 14, 15) . Ce mauvais pronostic est en partie dû à une **augmentation de la fréquence des lésions de la substance blanche** du cerveau qui surviennent plus facilement en cas d'infection (leucomalacies et anomalies de structure), ces lésions exposant elles mêmes à une augmentation du risque d'infirmité motrice cérébrale(14, 15). Ainsi, la prise en charge de plus en plus précoce d'enfants prématurés ne semble pas s'être accompagnée d'une diminution des handicaps liés à la prématurité ... peut être en partie du fait de la prise en charge d'enfants de plus en plus prématurés nés dans un contexte infectieux(16) .

1.2.2 Le type de germes retrouvés, leur origine et le mécanisme envisagé

Normalement, le liquide amniotique est stérile et moins de 1% des patientes accouchant à terme ont un liquide amniotique dans lequel des micro-organismes sont retrouvés(8). La fréquence de l'infection du liquide amniotique est d'environ 15 % parmi les femmes en menace d'accouchement prématuré, de 25 % si on ne considère que celles qui vont réellement accoucher prématurément, et de 40 % si on utilise des techniques bactériologiques sophistiquées pour rechercher des micro-organismes difficiles à cultiver(8). Cette fréquence de l'infection du liquide amniotique est peut être encore sous estimée du fait du nombre important de micro-organismes non identifiés(17).

Les principaux micro-organismes cultivés à partir du liquide amniotique des grossesses compliquées d'accouchement prématuré sont: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Fusobacterium species*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.* Les principales hypothèses actuelles pour expliquer l'infection du liquide amniotique et des membranes suggèrent que la majorité de ces organismes d'origine vaginale ont envahi l'utérus gravide par un mécanisme ascendant (18). Les bactéries semblent infecter la décidua puis s'étendre aux membranes, au liquide amniotique et finalement au fœtus. En outre, on a montré que ces micro-organismes du liquide amniotique étaient de même type que ceux retrouvés au niveau du vagin(18) - Romero a schématiquement distingué 4 stades à cette ascension (Figure 1)(18). La voie hématogène existerait mais serait d'une bien moindre importance (18 , 19).



Bien que ces micro-organismes isolés du liquide amniotique soient de virulence assez faible, il est admis que leur présence dans l'utérus stimule l'infiltration et l'activation des neutrophiles, amenant à une augmentation de la synthèse et du relargage des cytokines pro inflammatoires, prostaglandines et métalloprotéases, aboutissant à une maturation du col, à la rupture des membranes, à la survenue de contractions utérines puis à l'accouchement prématuré (19). Il a été montré que la présence d'Ureaplasma détecté par PCR – alors qu'elle ne l'avait pas été par culture – avait la même valeur pronostique défavorable qu'en cas de culture positive (20). **Il est de plus en plus probable que cette ascension des germes a lieu au début de la grossesse.** En effet, lorsque ces germes anaérobies sont retrouvés après **recherche par PCR dans le liquide amniotique au début du 4^e mois** – lors de recherches menées au décours d'amniocentèses réalisées pour caryotype – le taux d'avortement tardifs ou d'accouchements prématurés des femmes enceintes concernées est très important, compris entre 60 et 90 % (21-23).

1.2.3 Les micro-organismes vaginaux, leur rapport avec la prématurité

La vaginose bactérienne

La flore vaginale normale est habituellement composée de lactobacilles producteurs d'acides lactique (100%) et d'H₂O₂ (70%) (flore de Doderlein). De manière physiologique, elle est en équilibre avec des germes aérobies et anaérobies ou apparentés présents en très petite quantité, peu visibles sur les étalements, apparentés aux germes des voies digestives : *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus spp*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Fusobacterium*, *Gardnerella vaginalis*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides species*, *Prevotella*, *Mobilincus*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*, *Atopobium vaginae*.

Le trouble le plus commun de cette flore est la vaginose bactérienne (VB), qui se définit par le remplacement de la flore vaginale normale par ces germes anaérobies ou apparentés, dont les types

Figure 2.

Score de Nugent [24] (J Clin Microbiol 1991;29:297-301).
(Tableau proposé aux biologistes dans l'étude PREMEVA1)

Calcul du **SCORE DE NUGENT** en s'aidant du tableau (entourer les cases)
(Sur dix champs où les densités bactériennes et cellulaires sont les plus abondantes)

Morphotypes Quantité/champ (immersion objectif 100)	> 30	6 à 30	1 à 5	< 1	0
Morphotype lactobacilles: Bacilles à Gram+ à bords parallèles	0	1	2	3	4
Morphotype Gardnerella et anaérobies: Bacilles à Gram variable, cônes/polyformes polymorphes	4	3	2	1	0
Morphotype Mobilincus : Bacilles incurvés à Gram variable (coup d'angle)	2	2	1	1	0

Cellules indicatrices (clue cells) oui non
(La présence de clue cells est en faveur d'une vaginose)

SCORE DE NUGENT (addition des 3 scores entourés) :
A REPORTER SUR LA FEUILLE DE DEPISTAGE

gardnerella et mobilincus sont les plus caractéristiques. La meilleure manière de repérer la présence de ces germes en trop grande quantité au niveau vaginal est de réaliser un frottis vaginal après coloration de gram , puis de décrire l'aspect du frottis. Le score le plus utilisé et le plus reproductible est celui proposé par Nugent et coll (24) (Figures 2 et 3). Selon ce score qui consiste à compter les trois morphotypes bactériens Lactobacillus, Gardnerella et Mobilincus après coloration de Gram, la flore vaginale est dite « 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).

Plusieurs études ont montré **un doublement du**

risque de prématurité en cas de vaginose bactérienne(7, 11, 16, 25-28).

Les germes de la cavité vaginale étudiés individuellement

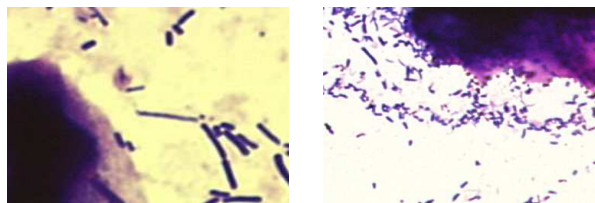
Il s'agit principalement de : *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Fusobacterium species*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp* *Mobilincus curtisii*, *Mobilincus mulieris*, *Atopobium vaginae*.

Nous mettrons en effet à part le *Streptocoque agalactiae* et *Escherichia coli* dont les études montrent que la présence dans les voies génitales en cours de grossesse n'augmente pas significativement le risque d'accouchement prématuré(29).

A l'inverse de la vaginose bactérienne et alors qu'ils lui sont liés – et qu'ils sont retrouvés dans le liquide amniotique des femmes qui accouchent prématurément - , aucun de ces micro-organismes qui composent ainsi la flore vaginale « anaérobie ou apparentée » n'a pu faire la preuve de son lien avec l'accouchement prématuré de manière indiscutable(30-33). En effet, les données concernant ces germes sont contradictoires. Certaines études évoquent un lien entre la présence de ces germes et la survenue d'un accouchement prématuré(34-36) d'autres non(25, 31, 32, 37).

Figure 3

Flore vaginale équilibrée (a), vaginose bactérienne (b)



a) Flore équilibrée (Nugent = 0).

Noter la présence de lactobacilles longs et fins, l'absence d'autres germes. Les bords de la cellule épithéliale vaginale sont rectilignes

Nugent=0 : Lactobacilles nombreux (0), Gardnerella absents (0), Mobilincus absents (0)

b) Vaginose bactérienne (Nugent = 8)

(aspect de « Clue-cell »)

Noter la disparition quasi-complète des lactobacilles, l'aspect irrégulier des membranes de la cellule épithéliale vaginale(en voie de lyse) et la présence de nombreux micro-organismes à gram variable (Mobilincus :aspect en « coup d'ongle » , faible gram)

Nugent=8 : Lactobacilles absents (4), Gardnerella moyenne quantité (2), Mobilincus présents ++ (2)

Globalement, on peut dire que ces études sont très insuffisantes, notamment du fait :

- des difficultés de culture et d'identification de ces germes, dont certains sont de découverte récente et invisibles sur une coloration de Gram (*Atopobium vaginae*)
- d'un manque de puissance et de biais de sélection, la plupart ayant été réalisées dans des petites séries chez des patientes en menace d'accouchement prématuré
- au fait que ces germes peuvent être présents en même temps, et que la part de chaque micro-organisme est difficile à étudier indépendamment des autres

1.2.4 Risque de prématurité d'origine infectieuse :

possibilités de traitement et recommandations

Il existe une possibilité pour que le traitement antibiotique de certains facteurs de risque de prématurité – de type infectieux – permette d'éviter une partie des accouchements prématurés spontanés.

La méta-analyse de Smaill (38) montre que le traitement antibiotique **des bactériuries asymptomatiques** de la femme enceinte s'accompagne d'une diminution non significative du risque d'accouchement prématuré (< 37 SA)(OR = 0.37 [0.10-1.36]), mais permet de réduire significativement le risque d'accoucher d'un enfant de petit poids de naissance (< 2500 grammes) (OR 0.66 [0.49-0.69]).

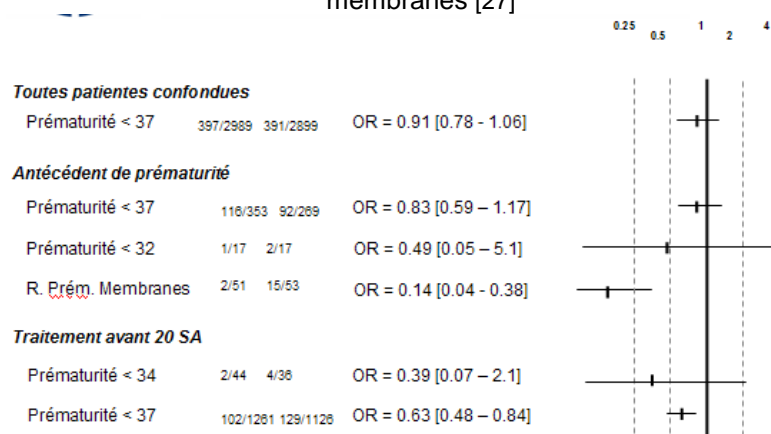
Pour ce qui concerne la **vaginose bactérienne**, les données les plus récentes sont contradictoires(27). Elles montrent un intérêt au traitement antibiotique par voie orale uniquement dans certains sous groupes de patientes porteuses de cette anomalie (Figure 4).

- Chez les femmes aux antécédents de prématurité, la recherche et le traitement antibiotique d'une vaginose s'accompagne d' **une réduction significative du risque de rupture prématurée des membranes** (OR=0.14 [0.05- 0.38]), mais sans diminution significative du risque de prématurité (< 37 SA) (OR = 0.83 [0.59-1.17]). La diminution du risque de grande prématurité (< 32 SA) pourrait être intéressante mais est loin d'être significative (OR = 0.49 [0.05-5.08]).

- Chez les femmes traitées pour la vaginose bactérienne avant 20 SA et quel que soit le motif de la recherche de l'anomalie, sa recherche et son traitement seraient associés à une **réduction significative de la prématurité < 37 SA** - OR= 0.63 [0.48-0.84].

Il existe donc une possibilité pour que des traitements antibiotiques soient efficaces pour diminuer le risque de prématurité, pourvu qu'ils aient été administrés *per os* avant que les mécanismes de la prématurité soient enclenchés et que l'on se soit adressé aux patientes porteuses de germes susceptibles d'augmenter réellement leur risque d'accoucher prématurément

Figure 4. Méta-analyse de McDonald et coll (2007). Effets de l'antibiothérapie sur le risque de prématurité et de rupture prématurée des membranes [27]



Les recommandations faites en France par la Haute Autorité de Santé indiquaient en 2001 la nécessité d'un dépistage et d'un traitement oral de la vaginose bactérienne chez les femmes aux **antécédents d'accouchement prématuré** et la nécessité de **travaux complémentaires chez les femmes à bas risque** (39). Alors que plusieurs types de traitement étaient disponibles (secnidazole, métronidazole, clindamycine), la Haute Autorité de Santé recommandait d'utiliser un traitement par métronidazole pour traiter la vaginose bactérienne (métronidazole *per os* (1 g/j pendant 7 jours ou 2 g en dose unique)

1.2.5 Biologie moléculaire : progrès dans l'identification des micro-organismes

La PCR (polymerase chain réaction) est une technique ancienne de 20 ans, mais qui bénéficie encore d'avancées récentes. Depuis dix ans environ, le séquençage des germes anaérobies et apparentés permet d'entrevoir des progrès importants dans la compréhension des mécanismes qui amènent à la prématurité.

D'un côté en effet, la PCR a permis de mieux connaître les micro-organismes qui colonisent les membranes et le liquide amniotique en cas de prématurité. Dans une étude menée entre 2004 et 2007 chez 46 patientes présentant une menace d'accouchement prématuré suivie d'accouchement prématuré(40), Han et al ont montré la présence de germes dans 21 cas parmi 46 (46 %) dont seulement 16 avaient été dépistés par la culture (35 %). Les germes les plus fréquemment rencontrés étaient : *Fusobacterium*, *Ureaplasma*, *Leptotrichia*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacteroides* et *Mycoplasma*. La PCR avait identifié tous les cas d'infection identifiés par la culture classique et montré que la présence de plusieurs micro-organismes dans le liquide amniotique était fréquente (dans 8 cas parmi 21 (38 %)). Elle montrait également que deux tiers des micro-organismes présents dans le liquide amniotique étaient impossibles ou difficiles à cultiver par les méthodes bactériologiques classiques(40).

De l'autre et depuis les travaux de Fredricks en 2005(41, 42), on a pu séquencer la plupart des germes de la cavité vaginale et découvrir de nouveaux micro-organismes vaginaux, jusqu'ici inconnus(41). Enfin, des travaux français ont permis de confirmer qu'un simple auto prélèvement vaginal suivi de « real time PCR » (PCR quantitative) permet la recherche aisée de micro-organismes vaginaux habituellement difficiles à cultiver(43). En outre, cette équipe a pu montrer que la présence d'*Atopobium vaginae*, impossible à visualiser sur une coloration de gram, est très associé à la présence d'une vaginose bactérienne(44). Enfin, les mêmes auteurs ont montré que la moitié des patientes porteuses d'une flore vaginale « intermédiaire » selon le score de Nugent (compris entre 4 et 6) sont porteuses de taux très élevés d'*Atopobium vaginae* et de *Gardnerella vaginalis* en même temps que de taux très faibles de *Lactobacillus*, permettant d'envisager chez elles une perturbation de flore pratiquement identique à celle qui existe en cas de vaginose bactérienne avérée (score compris entre 7 et 10) (non publié, article soumis).

Ainsi, **les progrès majeurs réalisés par la PCR dans le domaine des germes anaérobies et apparentés depuis 5 ans(41-43, 45)** permettent donc d'envisager de réexaminer les relations qui existent en portage de micro-organismes de la cavité vaginale et risque de prématurité :

- en réalisant des prélèvements vaginaux **dès le premier trimestre** chez un **grand nombre de patientes** afin de s'affranchir des biais que connaissent beaucoup d'études en s'adressant uniquement à des patientes à haut risque, le plus souvent en cours d'hospitalisation pour menace d'accouchement prématuré,
- en réalisant une recherche de plusieurs micro-organismes vaginaux **dans un même temps** et en permettant d'étudier de manière plus précise le risque de prématurité lié à la présence de **chaque germe à un niveau statistiquement tenu constant des autres** (ce qui n'a pas pu être réalisé jusqu'ici)
- en cherchant à savoir si **certains micro-organismes vaginaux sont liés à un risque de prématurité spontanée qui serait supérieur** non seulement à celui des autres micro-organismes présents, mais également à celui de la vaginose bactérienne repérée par un score de Nugent ≥ 7 (évalué à 2 environ).
- en envisageant ainsi de **mieux comprendre le rôle des modifications de la flore vaginale dans l'augmentation du risque de prématurité** et de guider les recherches futures pour trouver un traitement préventif le plus adapté possible

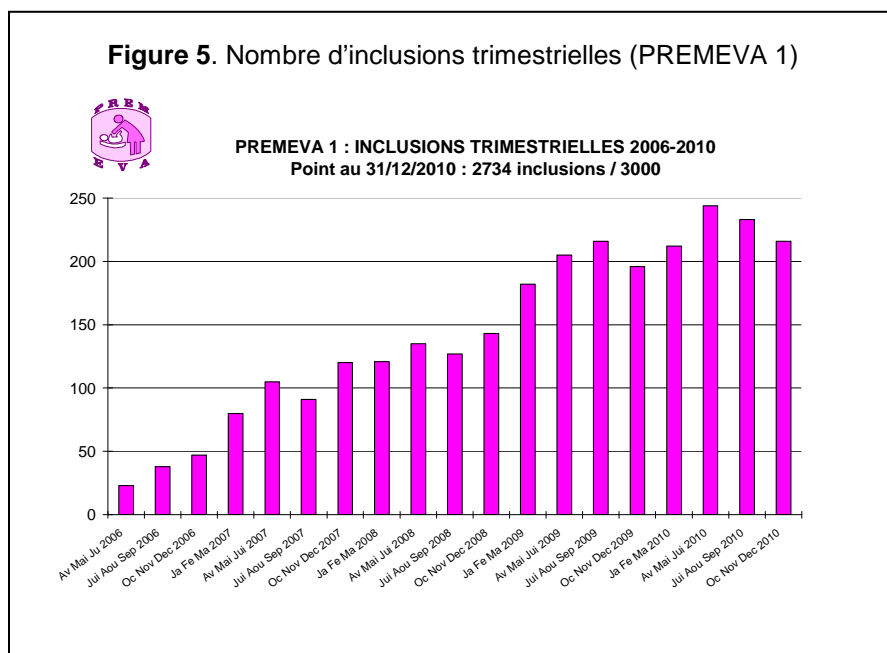
1.3. L'étude PREMEVA1 comme essentiel « point de départ »

Depuis 2006, l'ensemble des maternités (n=35) et Laboratoires de Biologie Médicale(n=202) de la région Nord Pas de Calais se sont mobilisés pour mener un essai de très grande envergure qui se terminera le 31 août 2011 (PREMEVA, ensuite nommé PREMEVA1). Cet essai a pour but, chez des femmes enceintes **présentant une vaginose bactérienne dépistée avant 13⁺ SA**, de **diminuer la fréquence des avortements spontanés tardifs et des accouchements spontanés très prématurés (16 – 32 SA)** par la prescription précoce de clindamycine par voie orale.

L'essai avait reçu l'avis favorable du comité de protection des personnes de notre région (5 octobre 2004). Il a débuté le 2 mai 2006 et a consisté à proposer à toutes les femmes enceintes de la région de réaliser gratuitement un auto prélèvement vaginal au premier trimestre de la grossesse (au laboratoire), afin de dépister l'existence d'une vaginose bactérienne. Une formation à la réalisation du score de Nugent a été réalisée sur place dans tous les laboratoires de l'étude (grâce à un DVD réalisé pour les besoins de l'étude). Après lecture, le score était transmis à la patiente et à son prescripteur. Les patientes porteuses de vaginose bactérienne (score de Nugent ≥ 7) étaient invitées à participer à un essai randomisé dont les modalités étaient différentes selon qu'elles avaient déjà accouché prématurément ou non. **Si les femmes n'avaient pas accouché prématurément antérieurement, (groupe dit « à bas risque »)** elles étaient invitées à recevoir un traitement comportant soit trois cures de clindamycine 600 mg pendant 4 jours à un mois d'intervalle, soit une seule cure de clindamycine 600 mg pendant 4 jours puis deux cures de placebo à un mois d'intervalle, soit trois cures de placebo à un mois d'intervalle (la randomisation se faisait par appel téléphonique du serveur 24/24, les traitements étaient délivrés en double aveugle). **En cas d'antécédent d'accouchement prématuré (groupe dit « à haut risque »)**, les patientes étaient invitées à recevoir un traitement comportant soit une seule cure de clindamycine 600 mg pendant 4 jours, soit trois cures de clindamycine 600 mg pendant 4 jours à un mois d'intervalle. La randomisation et la délivrance des traitement étaient réalisés de la même manière, en double aveugle. Les principales données concernant l'étude sont accessibles sur le site www.premeva.com.

Le nombre de sujets nécessaire pour terminer l'étude a été calculé à 3000 patientes en tout pour les femmes des groupes à bas risque (n=2700) et haut risque (n=300) cumulés, ce qui impliquait de dépister environ 80 000 patientes en 4 années et demie (fin prévue le 31 décembre 2010).

Au 31 décembre 2010, environ 72 000 dépistages ont été réalisés et 2734 patientes ont été incluses dans les deux bras de l'essai randomisé (n=2502 pour le groupe à bas risque, 232 pour le groupe à haut risque). **Restent donc 266 patientes à inclure** (voir courbe des inclusions Figures 5 et 7, pages 16 et 17). L'étude

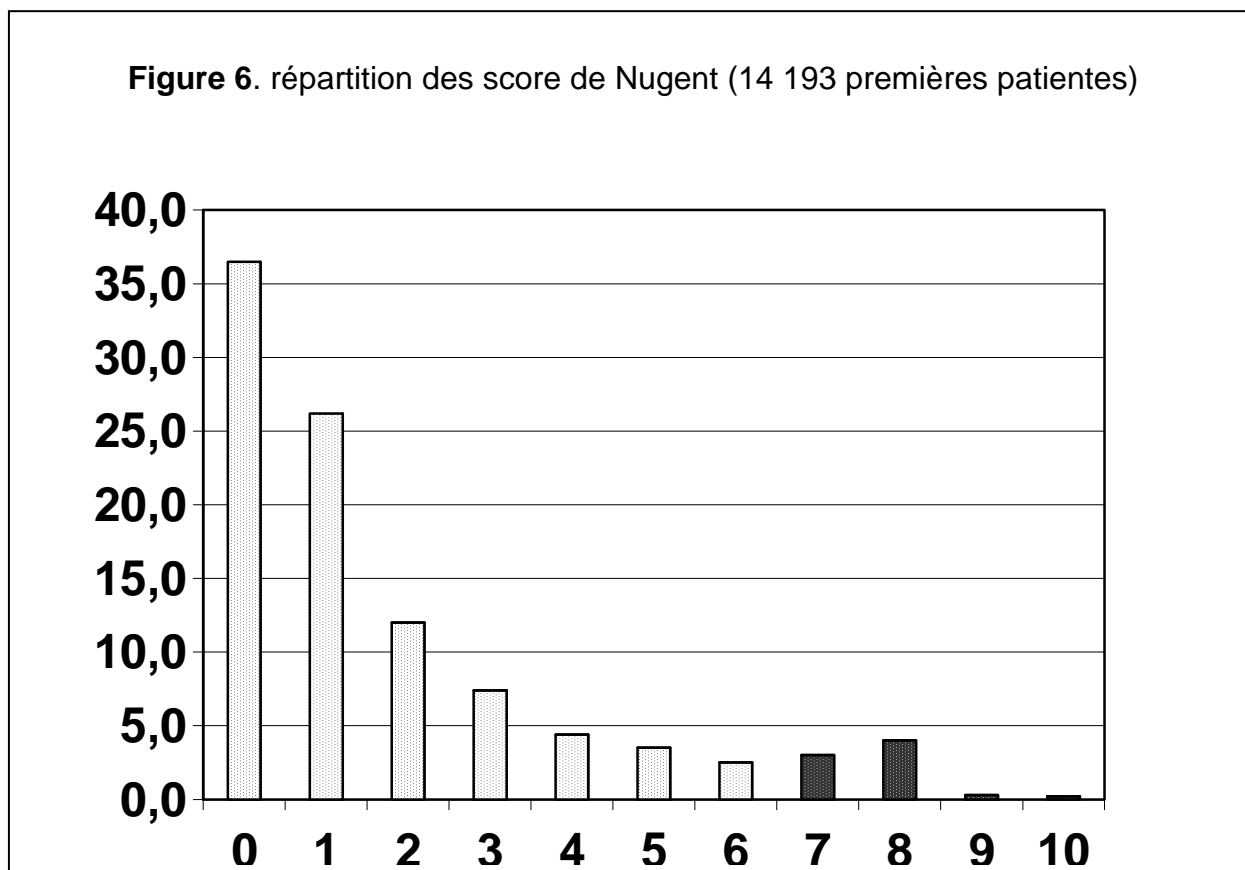


pourra donc se terminer au cours du premier semestre 2011 (compte tenu de la péremption des traitements, la date au delà de laquelle l'étude ne pourrait se poursuivre est arrêtée au 31 août 2011).

Comme dans tout essai randomisé, les résultats de l'étude PREMEVA 1 ne seront disponibles qu'après l'accouchement de la dernière patiente incluses et levée d'aveugle des 3000 randomisations. Des résultats préliminaires sont en cours de publication

La fréquence de la vaginose est restée stable dans l'étude PREMEVA1, aux alentours de 7 %, ce qui est inférieur aux chiffres annoncés dans d'autres pays notamment aux USA, plutôt compris entre 10 et 20 % (11). Ils correspondent mieux aux chiffres retrouvés en Europe (46-48). La relecture des 3000 premières lames de l'étude par deux microbiologistes experts en bactériologie a montré un très bon accord entre leur diagnostic et celui des biologistes des Laboratoires de Biologie Médicale (Kappa = 0.91). La répartition des scores de Nugent indique que les scores 9 et 10 sont rares, par rareté des Mobilincus à l'examen direct (Figure 6). Enfin, les données concernant les 14 193 premières patientes indiquent que la prévalence de la vaginose bactérienne est de 7.1% (95% CI: 6.6%-7.5%). En analyse multivariée, les facteurs liés indépendamment les uns des autres à l'existence d'une vaginose

bactérienne étaient L'existence d'un tabagisme maternel (ORa: 1.38; IC95: 1.19-1.60), l'âge maternel inférieur à 20 ans, (ORa: 1.40; IC95: 1.01-1.93), un niveau d'éducation néant ou primaire (ORa: 1.77; IC95: 1.35-2.31); ou secondaire OR: 1.27; IC95: 1.10-1.48). L'ensemble de ces résultats sont soumis à publication scientifique.

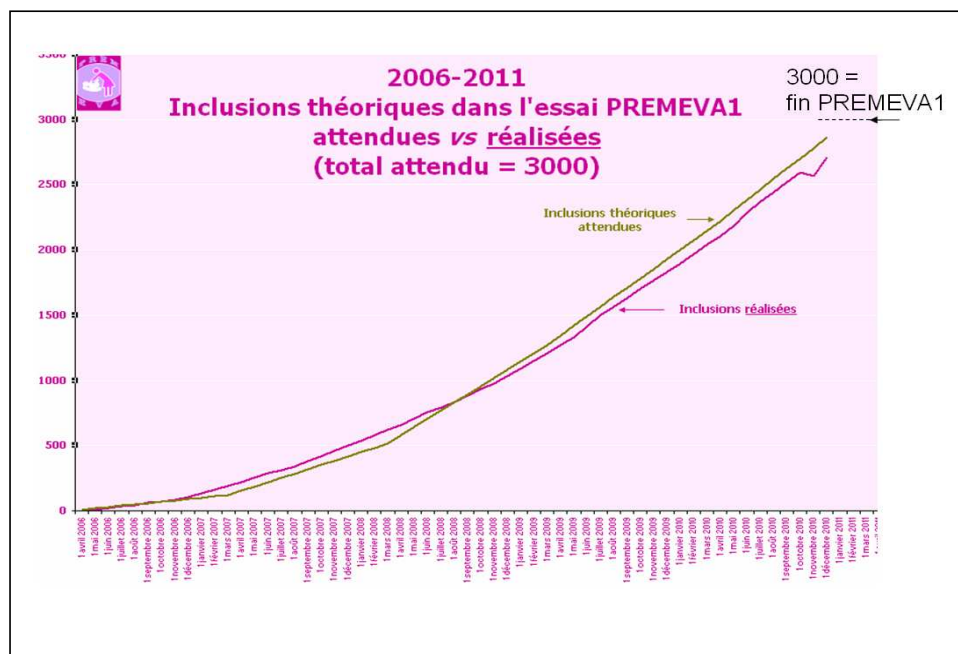


Sans cette étude PREMEVA1 et la formidable mobilisation qu'elle a entraîné, il ne serait pas possible d'envisager l'étude PREMEVA2 que nous proposons ici. En effet, et sans entrer dans le détail, une réorganisation importante a été mise en place

- Pré-étude de faisabilité de l'auto-prélèvement vaginal réalisé chez 398 patientes volontaires dans trois laboratoires différents (publiée en 2006) (49)
- Réalisation d'un DVD destiné à la formation sur site des 202 Laboratoires de Biologie Médicale: accueil des patientes pour proposer le dépistage, formation au score de Nugent avec contrôle de qualité ; fabrication d'outils de communication : plaquettes (200 000), posters (800), lettres d'information, mémos, calendriers, consentement, cahiers d'observation destinés à l'étude (testés).

- Formation **sur site des 202 laboratoires** et mise en réseau des laboratoires privés (Association des Biologistes Nord Picardie ABRNP) et publics (laboratoires de bactériologie des Centres Hospitaliers)
- **Ouverture sur site des 35 cliniques et maternités investigateurs du Nord Pas de Calais.**
Signature de conventions avec les 35 centres et avec l'ABRNP
- Mise en place d'une **organisation de ramassage des 80 000 lames, consentements au dépistage, contrôle de qualité des scores de Nugent** (les 3000 premières lames ont été relues par deux bactériologistes du CHRU de Lille)
- 2006-2011 : **communication** avec les collaborateurs de l'étude : **confection et maintien d'un site de liaison Internet** (www.premeva.com), visites d'élèves délégués médicaux chez 320 médecins généralistes de la métropole lilloise, conférences de presse (x4), diffusion d'une **Newsletter PREMEVA** (35 numéros mensuels). Afin d'informer les médecins généralistes, une cinquantaine d'EPU ont été réalisés au sein de la région Nord Pas de Calais (principales dates sur le site de l'étude). Les principaux relais de communication sont accessibles sur le site www.premeva.com.

Figure 7 Courbe des inclusions dans l'étude PREMEVA (par rapport à la courbe attendue)
La courbe des inclusions devrait croiser les 3000 inclusions vers le mois d'avril 2011.



2. Description de l'étude

2.1 But

Mesurer le **risque de prématurité spontanée associé à la présence de sept micro-organismes potentiellement impliqués dans la vaginose bactérienne**, recherchés par **PCR au premier trimestre de la grossesse** : *Gardnerella vaginalis*, *Mobilincus curtisii*, *Mobilincus mulieris*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Lactobacillus species*.

Etudier le **rôle spécifique de chacun d'entre eux** sur le risque d'accouchement prématuré spontané.

2.2 Population et méthode.

Il s'agit d'une étude rétrospective « cas-témoins » consistant

- dans un premier temps, à réaliser un prélèvement vaginal chez 20 000 patientes consultant en début de grossesse, à analyser la flore bactérienne par coloration de Gram chez toutes ces patientes (score de Nugent rendu au prescripteur et à la patiente) puis à stocker ces 20 000 prélèvements jusqu'à l'accouchement.
- Dans un deuxième temps, à réaliser 1000 analyses par PCR de la flore vaginale parmi ces 20 000 prélèvements : 500 correspondant à des patientes ayant présenté un accouchement prématuré spontané avant 37 SA, et 500 correspondant à des patientes témoins ayant accouché à terme.

2.2.1 Le prélèvement au premier trimestre de la grossesse

Toutes les femmes enceintes de la région Nord Pas de Calais **consultant pour déclaration de grossesse avant 13 SA** ^{*6} sont susceptibles de participer à l'étude. Sont exclues les patientes mineures, parlant mal le français, de plus de 14 SA, ou envisageant d'accoucher dans une maternité située hors de la région.

Lors de leur déclaration de grossesse, la patiente se voit expliquer la possibilité de participer à l'étude PREMEVA 2. Pendant cet entretien, **une plaquette** et une **lettre d'information** lui sont remises qui

expliquent le but et les modalités de l'étude. (Plaquette PREMEVA1 et lettre d'information PREMEVA2 en pages 40 et 42). Il s'agit, en même temps qu'elle réalisera les examens habituels de surveillance de grossesse au laboratoire, de réaliser **deux auto prélèvements vaginaux**. Il lui est indiqué que l'un d'entre eux servira à rechercher l'existence d'une modification de la flore bactérienne vaginale susceptible d'être traitée dans certains cas. Le résultat de cet examen lui sera communiqué ainsi qu'à son médecin. L'autre ne sera analysé que chez une partie seulement des patientes, à visée de recherche, et ces résultats ne seront pas communiqués (lettre d'information en page 40).

Au Laboratoire de Biologie Médicale, la proposition de participer à l'étude PREMEVA2 est à nouveau faite à la patiente. Le but de l'étude lui est rappelé, et son consentement écrit demandé. Une fiche est remplie qui comporte : renseignements généraux, parité, antécédents de prématurité, tabagisme, lieu d'accouchement prévu. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont vérifiés (Annexe page 44). En cas d'accord (écrit), la femme est ensuite invitée à *réaliser les deux auto prélèvements vaginaux simultanément*. Un local dédié est mis à sa disposition : salle de prélèvements fermant à clef, toilettes (schéma remis pour faire l'auto prélèvement, annexe 45).

L'un des deux prélèvements est étalé dans les deux heures pour réalisation d'un score de Nugent.

L'autre est placé dans un milieu spécifique et congelé à -20°C.

Le résultat du score de Nugent est transmis au médecin prescripteur et à la patiente – en même temps que les autres résultats (toxoplasmose, rubéole, protéinurie...) - avec le commentaire suivant concernant la flore vaginale:

Etude PREMEVA2. Score de Nugent \leq 6. Flore considérée comme normale.

Etude PREMEVA2. Score de Nugent \geq 7. Vaginose bactérienne.

En cas d'antécédent de prématurité spontanée (accouchement avant 8 mois), il est conseillé de prescrire un traitement par métronidazole (500 mg x2 pendant 7 jours)

Recommandations de la Haute Autorité de Santé, année 2001

Toutes les fiches de prélèvement sont transmises par fax à l'unité de recherche clinique PREMEVA2

2.2.2 Rôle de l'Association des Biologistes Nord Picardie (ABRNP)

Le **technicien de l'ABRNP** continuera à jouer le rôle essentiel qu'il joue dans l'étude PREMEVA1, en collaboration avec les responsables de l'Association (Dr JC DUGIMONT, Mme C. NOLF). Son rôle sera également de centraliser et d'extraire les écouvillons stockés au congélateur, en lien avec la sage-femme de recherche clinique PREMEVA2.

- organisation de **réunions de médecins et pharmaciens biologistes par territoire de santé** pour expliquer le but et les modalités de l'étude PREMEVA2 ; maintien d'une dynamique au sein des laboratoires vis à vis de l'étude. **Création et diffusion d'une « Newsletter » mensuelle** permettant de maintenir une attention/information de qualité pendant toute l'étude
- **passage tous les trois mois dans chacun des 200 Laboratoire de Biologie Médicale** du Nord Pas de Calais afin d'exposer les nouvelles modalités de prélèvement (écouvillon e-swab pour PCR + écouvillon sec pour Nugent), rappeler la technique de Nugent, former les nouveaux techniciens, mettre en place l'étiquetage des écouvillons à congeler, avec numérotation unique par territoire de santé
- **installation, mise en fonction et organisation du stockage d'un congélateur** dans chacun des sept centres relais des territoires de santé ; **collection et transport de tous les échantillons du territoire tous les trois mois**, extraction des tubes collectés vers le CHRU après que la sage-femme de recherche clinique a déterminé les cas et les témoins pour les maternités du territoire de santé
- confection et distribution du matériel « en flux tendu » sous la forme de **20 000 « kits » de dépistage** dans les 200 laboratoires (chaque « kit » comprenant : lettre d'information, consentement éclairé, fiche de prélèvement, écouvillons pour le prélèvement)
- comptabilité des dépistage réalisés et **comptabilité financière pour le compte de la Délégation à la Recherche Clinique du CHRU de Lille**, par convention.

2.2.3 Rôle de l'unité de recherche PREMEVA 2

La **sage-femme de recherche clinique** recueille toutes les fiches de prélèvement des patientes prélevées. Celles-ci sont transmises par fax de manière hebdomadaire par les Laboratoires de Biologie Médicale (environ 100 fiches par jour, 5 jours sur 7). Elle réalise un fichier nominatif de personnes destiné à connaître pour chaque femme prélevée

- sa date prévue d'accouchement
- son lieu prévu d'accouchement (choix 1 et choix2) (annexe page 44)
- le lieu géographique du laboratoire ayant réalisé le prélèvement

Pour chaque patiente ayant un score de Nugent supérieur ou égal à 7 (vaginose bactérienne), elle adresse un courrier au médecin prescripteur de l'examen environ 3 à 6 semaines après réception du fax du laboratoire. Dans ce courrier, **il est demandé au médecin prescripteur si la patiente a reçu un traitement de la vaginose bactérienne**, et si oui lequel (métronidazole / secnidazole / clindamycine / autre ; voie orale « minute » / voie orale longue (4 à 7 jours)/ voie vaginale). Une enveloppe timbrée est jointe au courrier pour la réponse. En cas de non réponse, le médecin traitant est relancé par mail ou par fax, puis par téléphone.

2.2.4 La détermination des cas et des témoins à l'accouchement

Tous les trois mois, la sage-femme de recherche clinique passe dans chaque maternité et examine le **cahier d'accouchement**, document systématiquement rempli lors de toute issue de grossesse survenant après 15 SA et où figurent : le nom de naissance de la patiente, son prénom, sa date de naissance, ainsi que l'âge gestationnel à l'issue de grossesse. A partir de cette consultation, elle recherche les femmes dont l'issue est un accouchement prématuré spontané (entre 22⁺⁰ et 36⁺⁶ SA) et qui ont eu un prélèvement PREMEVA2 (patientes « cas »). **Pour chaque patiente « cas » elle détermine une patiente « témoin » ayant accouché de grossesse unique dans la même maternité, à un âge gestationnel supérieur à 37 SA d'accouchement.** Pour choisir cette patiente, elle effectue un appariement sur l'existence d'un prélèvement vaginal PREMEVA2, ainsi que sur le lieu et le jour de la naissance.

Le fait que les patientes aient eu un prélèvement vaginal dans le cadre de l'étude PREMEVA2 est recherché à partir du fichier nominatif des patientes qu'elle tient à jour, en fonction du nom de naissance, du prénom, de la date de naissance, de la date prévue d'accouchement et du lieu d'accouchement.

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

Sont considérés comme « spontanés » les accouchements prématurés survenus entre 22⁺⁰ et 36⁺⁶ SA, après ouverture spontanée du col ou rupture prématurée des membranes

Critères d'exclusion des cas : grossesse multiple, décès in utero, accouchement par césarienne ou déclenchement artificiel pour pathologie foetale/maternelle autre qu'une prématurité spontanée/rupture prématurée des membranes.

Les patientes « témoins »

Leur appariement est déterminé par la sage femme de recherche clinique grâce au cahier d'accouchement. Il s'agit de la première femme ayant accouché juste avant la patiente « cas » et pour laquelle l'accouchement est survenu

- après 37 SA,
- quelle que soit la voie d'accouchement et la nature du travail,
- et pour laquelle il a existé un prélèvement vaginal PREMEVA2 en début de grossesse.
- à l'exclusion des grossesses multiples et des morts in utero,

Si la patiente ne répond pas à ces 4 critères, la sage femme « remonte » sur le cahier d'accouchement jusqu'à ce qu'une patiente corresponde à ces 4 critères, même s'il l'accouchement est survenu dans le ou les jours précédents.

2.2.5 Les données recueillies chez les cas et les témoins

Pour chaque femme « cas » ou « témoin » ayant accouché, la sage-femme accède au dossier obstétrical de la maternité et remplit un cahier d'observation succinct (annexe, pages 46 à 50) dans lequel figurent :

- les **critères d'inclusion et d'exclusion** des cas et des témoins (page 1/5)
- les **antécédents obstétricaux** de la patiente (page 2/5)
- les données concernant **la grossesse** (pathologies, hospitalisation) (page 3/5)
- les données concernant **l'accouchement** (page 4/5)
- les données concernant **le nouveau-né** (page 5/5)

2.2.6 Stockage et transfert des écouvillons congelés à -20°C

Chaque Laboratoire de Biologie Médicale reçoit au début de l'étude des **plaques d'étiquettes uniques et anonymes** pour l'**identification des patientes**, composées d'un numéro d'identification et d'un code barre uniques, spécifiquement préparés pour l'étude. Le numéro d'identification débute par une lettre (A,H,L ou M selon chacun des 4 territoires de santé de la métropole) puis est suivi de 7 chiffres uniques qui indiquent l'identité du tube (fiche de prélèvement et cahier d'observation, annexe p 44 puis 46 à 50)..

Tous les trois mois et afin de libérer la place, les tubes stockés dans le congélateur – 20°C de chaque Laboratoire d'Analyse Médicale sont déstockés et **transportés dans l'un des congélateurs achetés pour les besoins de l'étude**, situés dans un laboratoire de Centre Hospitalier du Territoire de Santé (Valenciennes, Douai, Lens, Boulogne, Dunkerque, Calais, Lille). Le transport est effectué grâce au technicien de recherche de l'Association des Biologistes Nord Picardie, au moyen d'une enveloppe réfrigérée type KOALA® prévue pour ce type de transport.

A la fin de l'étude, lorsque les dossiers d'observation des 500 cas et des 500 témoins seront constitués, les tubes contenant les écouvillons de ces patientes seront transférés dans le Laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHRU de Lille (Pr COURCOL), dans lequel ils sont analysés par PCR. Les 19 000 autres tubes seront détruits.

2.2.7 Analyse des écouvillons par PCR

Les échantillons seront collectés et conservés à -20°C puis acheminés au laboratoire de Bactériologie Hygiène du CHRU de Lille par série de 250 tous les trois mois. Dès leur arrivée, ils seront conservés à -20°C. Les échantillons seront identifiés par leur code à barre, sans aucune distinction entre les cas et les témoins. Les échantillons seront décongelés par série et une partie du liquide sera d'abordensemencée sur milieu d'isolement pour la **recherche et la quantification des levures**, le restant sera utilisé par les réactions d'amplification génique. L'analyse comporte une première étape d'**isolement et d'extraction des acides nucléiques** à partir des sécrétions vaginales par un automate MagNaPure* (Roche). L'ADN ainsi extrait et purifié servira de matrice pour les réactions d'amplification génique. Tout matériel génique en excès sera stocké à -20°C pour d'éventuels contrôles complémentaires ou des investigations ultérieures concernant d'autres germes. La seconde étape est constituée par l'**amplification génique en chaîne à l'aide d'une polymérase ou Polymerase Chain Reaction (PCR)**. L'amplification de l'ADN bactérien sera effectuée à l'aide d'**amorces spécifiques** (morceaux d'une 20^{aine} d'acide nucléique) de plusieurs espèces bactériennes : *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, et *Lactobacillus spp.* La quantification de l'ADN sera réalisée par **PCR temps réel** impliquant la chimie TaqMan.. Cette approche consiste à ajouter une sonde TaqMan* qui va se fixer sur l'ADN bactérien au milieu de la zone amplifiée par les amorces et qui a la particularité de libérer une fluorescence à chaque cycle d'amplification. Cette fluorescence est d'autant plus importante que le nombre de gène à amplifier est élevé au départ.

Lors de l'amplification génique, nous utiliserons pour un même volume réactionnel deux sondes avec une couleur de fluorescence différente afin d'amplifier deux gènes spécifiques de deux bactéries différentes et détectées séparément par le lecteur. Cette stratégie, appelée **PCR duplex**, permettra d'**optimiser le matériel génique** car les rendements d'extraction d'ADN à partir des écouvillons vaginaux risquent d'être faibles. La détection quantitative de l'ADN bactérien sera effectuée par l'appareil ABI PRISM SDS 7500 (Applied Biosystem), en respectant les recommandations du fabricant. Lors de nos expérimentations, un gène humain, la **sérumalbumine**, sera également amplifié et quantifié. Il servira de **contrôle de qualité interne de l'extraction de l'ADN de l'échantillon vaginal**.

Une seconde approche de quantification sera également réalisée. Elle consistera à intégrer chaque gène cible amplifié par PCR quantitative dans un plasmide permettant la constitution d'une banque. Ils serviront à établir **une courbe d'étalonnage pour chaque gène spécifique des différentes espèces impliquées dans la vaginose bactérienne** (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, et *Lactobacillus spp*) et d'estimer avec précision la quantité de copies d'ADN présentes dans le mélange réactionnel.

La spécificité des couples d'amorces-sondes a été déterminée conformément aux données de la littérature(50). Ces couples d'amorces-sondes ont été également testés sur une collection de souches de référence des groupes bactériens que nous voulons étudier. La liste des amorces et sondes pour chaque espèce bactérienne et pour le contrôle interne figure en annexe , page 43.

Par souci d'optimisation des ressources humaines et matérielles, les écouvillons seront traités par série de 48 échantillons à raison de deux séries par jour.. Le tandem MagNaPure* pour l'extraction d'ADN et ABI PRISM SDS 7500 pour l'amplification/quantification d'ADN permet de garantir une meilleure reproductibilité inter-série de nos échantillons et un faible risque de contamination.

2.3 Analyse des résultats

2.3.1 Détermination du seuil de positivité pour chaque micro-organisme

L'analyse par PCR quantitative aboutira à déterminer pour chacun des 1000 écouvillons analysés une concentration de chacun des micro-organismes vaginaux, exprimée en puissance de 10 (10^4 , 10^5 , ..., 10^n). Pour chaque micro-organisme vaginal, une courbe ROC sera établie afin d'étudier la **variation de la sensibilité et de la spécificité pour la prématurité spontanée, en fonction de la charge microbienne retenue pour déclarer la présence ou l'absence du micro-organisme en PCR en temps réel**. La valeur seuil qui sera retenue sera celle qui donnera le meilleur contraste entre les cas et les témoins, en obtenant la meilleure sensibilité + spécificité avec une spécificité contrainte à un minimum de 90 %.

2.3.2 Calcul des risques en analyse univariée puis multivariée

Les patientes cas et témoins seront ensuite comparées en analyse univariée pour leurs caractéristiques générales, obstétricales et pour la présence de micro-organismes vaginaux aux seuils retenus. **Le rôle propre de chaque micro-organisme sera approché par son odds ratio (OR).**

L'utilisation d'un modèle de **régression logistique du risque d'accouchement prématuré sur les microorganismes retenus au seuil $p < 0.20$ en analyse univariée** permettra de mesurer le rôle propre de chaque micro-organisme vaginal à un niveau tenu constant des autres. Le rôle respectif de la vaginose bactérienne et de son traitement éventuel en cas de score de Nugent ≥ 7 seront explorés de la même façon, en forçant l'introduction de ces facteurs dans le modèle. Enfin, le lien entre ces micro-organismes vaginaux et les autres facteurs de risque de prématurité sera étudié (antécédent de prématurité, niveau d'étude faible, tabagisme, âge < 20 ans).

2.4 Nombre de sujets nécessaire

En analyse univariée, la mise en évidence d'associations statistiques significatives au risque $\alpha=0.05$ et avec une puissance de 80 % ($1-\beta=0.80$) nécessite d'inclure un nombre de naissances prématurées spontanées (« cas ») et un nombre équivalent de naissances « témoins » qui dépendent) à la fois :

- du **taux de portage supposé des micro-organismes vaginaux** dans la cavité vaginale des patientes « témoins ». Il est raisonnable de penser que ce taux sera d'au moins 5 % (33, 41-45)
- du **niveau le plus faible du risque (odds ratio)** que l'on désire mettre en évidence sous l'hypothèse statistique H1 d'une différence réelle entre cas et témoins. Il apparaît qu'**un OR inférieur à la valeur 2.0 pour les micro-organismes vaginaux mis en évidence serait pratiquement inférieur au risque de prématurité spontanée associée à l'existence d'une vaginose bactérienne dans la plupart des publications** (7, 11, 16, 25-28). L'objet de notre recherche rend donc légitime d'espérer des OR supérieurs à 2.0 pour les micro-organismes vaginaux les plus liés au risque de prématurité spontanée.
- enfin et de manière approximative mais robuste(51), la réalisation d'une régression logistique de la prématurité spontanée sur les micro-organismes vaginaux et les facteurs que nous avons décrits au paragraphe 2.3.2 nécessite que **le nombre sujets étudiés soit au moins égal à 15 fois le nombre de variables incluses dans les modèles étudiés**(51) .

Figure 6. Nombre de sujets à inclure par groupe en fonction de l'odds ration minimal attendu dans l'hypothèse d'une prévalence de 5% au moins des micro-organismes vaginaux dans le groupe « témoin » (a=0.05, 1-b=0.80, tests bilatéraux)

Taux de « portage » supposé du germe étudié dans la population témoin	Odds Ratio minimal sous l'hypothèse H1	Nombre de sujets nécessaire par groupe
5 %	2.0	559
5 %	2.5	301
5 %	3.0	199

Au total, **l'inclusion de 500 patientes par groupe** permettra de répondre aux objectifs que nous nous sommes fixés, en attendant un odds ratio ≥ 2.0 pour au moins l'un des 7 micro-organismes vaginaux étudiés, à un niveau statistiquement tenu constant des autres (Figure 6).

2.5 Calendrier d'étude

Le taux de prématurité spontané observé dans notre pays est voisin de 3.5 % environ(1, 2). Pour espérer inclure 500 patientes « cas » et 500 patientes « témoin » après exclusion des patientes accouchant de manière prématurée mais provoquée, des grossesses gémellaires, des patientes perdues de vues (5%), des décès *in utero* et des interruptions médicales de grossesse, ***l'inclusion de 20 000 patientes est nécessaire.***

Compte tenu de l'expérience accumulée pendant l'étude PREMEVA1 et grâce à la collaboration des médecins généralistes du Nord Pas de Calais, il est ***permis d'entrevoir une durée de un an pour réaliser ces 20 000 prélèvements.***

Les mois qui précéderont le 1^{er} septembre 2011 seront employés à préparer l'étude : organisation de ***plusieurs réunions dans les 4***

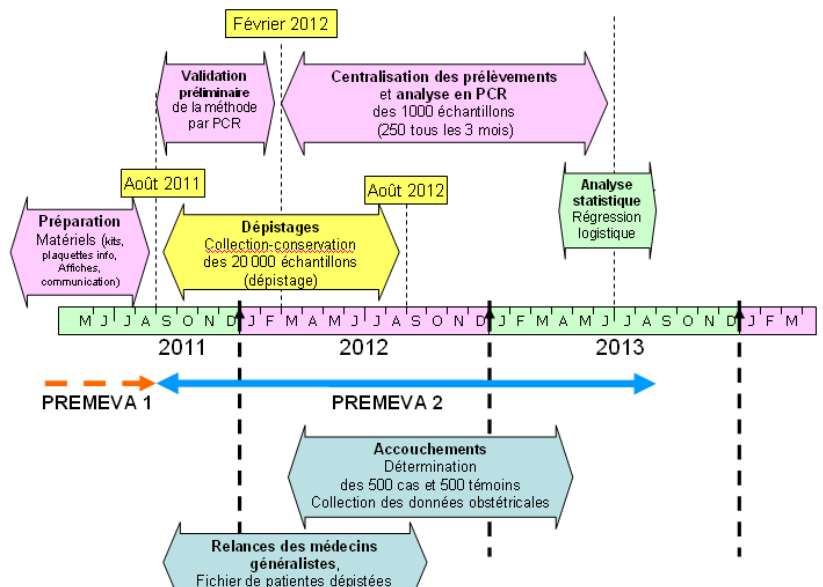
territoires de santé, visites du technicien de l'ABRNP dans chaque laboratoire, ***actions de communication et de sensibilisation, courriers*** à tous les médecins généralistes, gynécologues médicaux, gynécologues obstétriciens et sages-femmes du Nord Pas de Calais, soirée d'EPU. L'organisation de ***visites aux médecins généralistes par des élèves délégués médicaux*** est à

nouveau à envisager (réalisée les trois premières années de l'étude PREMEVA1).

Les ***prélèvements*** pourront débuter en septembre 2011, sur la lancée de PREMEVA1, et se terminer fin août 2012.

La ***mise au point des techniques de PCR pour chacun des sept micro-organismes vaginaux*** pourra être réalisée entre septembre 2011 et avril-juin 2012, moment des premiers accouchements et

Calendrier étude PREMEVA 2



des premiers ramassages d'écouvillons dans les laboratoires relais des 4 territoires de santé (accouchements à partir de février 2012). .

L'**analyse statistique** des données devrait donc avoir lieu entre les mois d'avril et septembre 2013.

2.6 Budget de l'étude

Il figure en annexe, à la page 36, et s'élève à 535 000 € : 170 000 €, de frais de personnel, 200 000€ de frais de prélèvements, 87 000 € de matériel de laboratoire à distribuer sous forme de « Kits » dans les laboratoires , et 61 400 € de frais d'organisation, de déplacement, de communication et de papeterie (courriers).

Les **frais en personnel** s'élèvent à 170 000 €, dont

- 18 mois de travail pour la **sage-femme coordinatrice de l'étude**, dont il est question en pages 22 et 23,
- 24 mois pour le **technicien de l'ABRNP** (page 21), qui servira de lien entre tous les laboratoires du Nord Pas de Calais avant, pendant et après la réalisation des auto prélèvements par les patientes. Le rôle de ces deux personnes est essentielle.
- du temps de **technicien laboratoire de biologie moléculaire (6 mois)** pour la mise eu point et la réalisation de techniques de PCR dont peu d'équipes ont la maîtrise actuellement (page 25)
- le temps de l'équipe PREMEVA2 qui coordonne ce projet n'est pas comptabilisé dans l'étude. Il s'agit principalement de temps de recherche hospitalier et hospitalo-universitaire, mais également du temps des membres de l'Association des Biologistes Nord Picardie, dont le rôle, la compétence et le dévouement sont essentiels à la réussite de l'étude.

Pour ce qui concerne le **travail et les techniques même du Laboratoire de Biologie Médicale** pour chaque prélèvement, ils ont été estimés « au plus juste » à 10 € par prélèvement (**soient 200 000 € au total**) : accueil des patientes, recueil des informations sur papier et informatique , explication sur

l'étude et l'auto-prélèvement, le traitement des deux auto-prélèvements, coloration de GRAM, conditionnement et stockage des tubes congelés (voir annexe page 37).

Le détail des autres postes de dépense figure en dans le budget, en annexe page 36.

2.7 Faisabilité

Le plateau technique de biologie moléculaire du laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHRU de Lille participe à de nombreuses études nationales et internationales dans le diagnostic moléculaire en temps réel des infections microbiennes et est donc rôdé à ce type d'approche. La PCR quantitative est d'ores et déjà utilisée de longue date en routine pour le diagnostic des infections à méningocoque ou à *Mycobacterium tuberculosis* par exemple et le type de quantification que nous voulons suivre dans ce PHRC est déjà utilisé au sein du laboratoire dans deux études portant pour l'une, sur les infections à *Pseudomonas aeruginosa* et pour l'autre, sur les infections à *Staphylococcus aureus*

La courbe des dépistages réalisés pendant les années 2006 -2011 pour l'étude PREMEVA1 montre que les médecins/pharmaciens biologistes, les professionnels de la naissance, les médecins généralistes, le groupe de pilotage de l'étude – Cercle des Hôpitaux Généraux, Association des Biologistes Nord Picardie) ont atteint les objectifs qu'ils s'étaient fixés, en réalisant environ 22 000 dépistages en 2009 puis à nouveau 22 000 dépistages en 2010. Dans ces conditions, la réalisation de l'étude PREMEVA2 nous semble possible (20 000 dépistages prévus en un an)

Bibliographie

1. Blondel B, Breart G, du Mazaubrun C, Badeyan G, Wcislo M, Lordier A, et al. [The perinatal situation in France. Trends between 1981 and 1995]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1997;26:770-80.
2. Blondel B, Supernant K, Du Mazaubrun C, Breart G. Enquête Nationale Périnatale. Rapport d'Enquête Unité INSERM 149; 2003; 2003.
3. Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, Andre M, Arnaud C, et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet* 2008 Mar 8;371:813-20.
4. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet* 2008 Jan 19;371:261-9.
5. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008 Jan 5;371:75-84.
6. Blondel B, Norton J, Du Mazaubrun C, Breart G. Enquête Nationale Périnatale 1998. Rapport d'Enquête Unité INSERM 149.
7. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
8. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006 Dec;113 Suppl 3:17-42.
9. Livinec F, Ancel PY, Marret S, Arnaud C, Fresson J, Pierrat V, et al. Prenatal risk factors for cerebral palsy in very preterm singletons and twins. *Obstet Gynecol* 2005 Jun;105:1341-7.
10. Kiss H, Pichler E, Petricevic L, Husslein P. Cost effectiveness of a screen-and-treat program for asymptomatic vaginal infections in pregnancy: towards a significant reduction in the costs of prematurity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006 Aug;127:198-203.
11. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1737-42.
12. Watts DH, Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA. The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1992;79:351-7.
13. Gilstrap LC, 3rd, Leveno KJ, Cox SM, Burris JS, Mashburn M, Rosenfeld CR. Intrapartum treatment of acute chorioamnionitis: impact on neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:579-83.
14. Murphy DJ, Sellers S, MacKenzie IZ, Yudkin PL, Johnson AM. Case-control study of antenatal and intrapartum risk factors for cerebral palsy in very preterm singleton babies. *Lancet* 1995;346:1449-54.
15. Wu YW, Colford JM, Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *Jama* 2000;284:1417-24.
16. Goldenberg RL, Culhane JF. Infection as a cause of preterm birth. *Clin Perinatol* 2003;30:677-700.
17. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999 May 21;284:1308-10.
18. Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Kim JC, Kim YM. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001;15:41-56.
19. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002 Apr;23:257-73.
20. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, 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* 2003 Oct;189:919-24.

21. Berg TG, Philpot KL, Welsh MS, Sanger WG, Smith CV. Ureaplasma/Mycoplasma-infected amniotic fluid: pregnancy outcome in treated and nontreated patients. *J Perinatol* 1999;19:275-7.
22. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, Thomson RB, Jr. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of Ureaplasma urealyticum. *Prenat Diagn* 1992;12:111-7.
23. 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* 1995;40:375-9.
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* 1991;29:297-301.
25. Donati L, Di Vico A, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2010 Apr;281:589-600.
26. Gravett MG, Hummel D, Eschenbach DA, Holmes KK. Preterm labor associated with subclinical amniotic fluid infection and with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1986;67:229-37.
27. McDonald HM, Brocklehurst P, Gordon A. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD000262.
28. McGregor JA, French JI, Jones W, Milligan K, McKinney PJ, Patterson E, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1048-59.
29. Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Dekker FW, Dorr PJ, Kanhai HH. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:958-67.
30. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010;2010.
31. Pararas MV, Skevaki CL, Kafetzis DA. Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006 Sep;25:562-9.
32. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG* 2011 Jan;118:164-74.
33. Viscardi RM. Ureaplasma species: role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol* 2010 Jun;37:393-409.
34. Donders GG, Van Calsteren C, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, et al. Association between abnormal vaginal flora and cervical length as risk factors for preterm birth. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010 Jan 26.
35. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG* 2009 Sep;116:1315-24.
36. Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, Park CW, Hong JS, Romero R, et al. Intraamniotic infection with genital mycoplasmas exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010 Sep;203:211 e1-8.
37. Lee SE, Romero R, Kim EC, Yoon BH. A high Nugent score but not a positive culture for genital mycoplasmas is a risk factor for spontaneous preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009 Mar;22:212-7.
38. Smaill F, Vazquez J. Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 2. Art. No.: CD000490. 2007.
39. ANAES. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. Paris: Agence d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES); 2001.
40. 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* 2009 Jan;47:38-47.

41. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005 Nov 3;353:1899-911.
42. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2007 Oct;45:3270-6.
43. Menard JP, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 Dec;29:1547-52.
44. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, et al. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010 Jan;115:134-40.
45. Fredricks DN, Marrazzo JM. Molecular methodology in determining vaginal flora in health and disease: its time has come. *Curr Infect Dis Rep* 2005 Nov;7:463-70.
46. Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol D, et al. Bacterial vaginosis: prevalence and predictive value of premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;108:146-51.
47. Gratacos E, Figueras F, Barranco M, Ros R, Andreu A, Alonso PL, et al. Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram stain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur J Epidemiol* 1999;15:913-6.
48. Hay PE, Morgan DJ, Ison CA, Bhide SA, Romney M, McKenzie P, et al. A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1994 Dec;101:1048-53.
49. Bresson L, Massoni S, Jailloux-Beaurain C, Bissinger MC, Subtil D, Husson MO, et al. Autoprélèvement vaginal à la recherche d'une vaginose bactérienne pendant la grossesse : étude pilote. *Gynecol Obstet Fertil* 2006 Sep;34:701-5.
50. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2008 Jul 1;47(1):33-43.
51. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol* 1996 Dec;49:1373-9.