

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements .....	xii
Avant-propos .....	xiii
1 Introduction .....	1
1.1 Grossesse.....	2
1.1.1 Généralités .....	2
1.1.2 Embryon et fœtus .....	3
1.1.3 Placenta.....	4
1.1.4 Liquide amniotique .....	4
1.1.4.1 Fonction .....	4
1.1.4.2 Production.....	5
1.1.4.3 Composition.....	5
1.2 Maladie parodontale .....	7
1.2.1 Définition et classification .....	7
1.2.2 Pathogénèse .....	9
1.2.3 Diagnostic et évaluation clinique .....	9
1.2.4 Épidémiologie .....	10
1.2.5 Effets de la maladie parodontale sur la santé .....	10
1.2.5.1 Bactériémie et inflammation systémique .....	10
1.2.5.2 Issues adverses de grossesse .....	11

1.2.5.2.1	Prématurité et petit poids de naissance .....	11
1.2.5.2.2	Prééclampsie.....	12
1.3	Inflammation amniotique.....	13
1.3.1	Définition.....	13
1.3.2	Marqueurs inflammatoires .....	14
1.1.5	Épidémiologie.....	14
1.1.6	Causes .....	15
1.1.7	Conséquences.....	17
1.1.7.1	Obstétricales.....	17
1.3.2.1	Fœtales.....	19
1.3.2.2	Néonatales.....	19
1.4	Troubles du neuro-développement.....	21
1.4.1	Définition.....	21
1.4.2	Épidémiologie.....	21
1.4.3	Étiologie.....	22
1.4.4	Facteurs de risque.....	24
1.4.5	Dépistage .....	25
1.5	Infection, inflammation et développement neurologique.....	26
1.5.1	Infection et inflammation néonatale et développement neurologique .....	26
1.5.2	Infection et inflammation périnatale et développement neurologique .....	27
1.5.3	Infection et inflammation durant la grossesse et développement neurologique.....	28
1.6	Hypothèse et objectifs.....	29
1.6.1	Hypothèse .....	29
1.6.2	Objectifs.....	29
2.	Periodontal Disease and Adverse Pregnancy Outcomes: A Prospective Study in a Low-Risk Population.....	30

2.1	Résumé.....	31
2.2	Abstract.....	32
2.3	Introduction .....	33
2.4	Methods .....	33
2.5	Results .....	34
2.6	Discussion.....	35
2.7	Conclusion .....	37
2.8	o 22.55 .....	39
3.	Midtrimester subclinical intra-amniotic inflammation and subsequent development of abnormal gross motor skills in infants born either term or preterm .....	40
3.1	Résumé.....	41
3.2	Abstract.....	42
3.3	Introduction .....	43
3.4	Methods .....	44
3.5	Results .....	45
3.6	Discussion.....	46
3.7	Conclusion .....	48
4.	Discussion et conclusion .....	52

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Catégories des causes de retard de développement.....	22
Table 2.1. Characteristics of the participants .....	38
Table 2.2. Multivariate regression analysis for factors related to preeclampsia .....	39
Table 3.1: Characteristics of the participants* .....	49
Table 3.2: Distribution of the ASQ results .....	50

## Liste des figures

Figure 3.1. Markers of inflammation and number of failed ASQ categories .....	51
---	----

## Liste des abréviations

AAP :	Académie Américaine de Parodontologie
aOR:	Adjusted odds ratio
ASQ:	Ages and Stages Questionnaire
BMI:	Body mass index
CI :	Confidence Interval
CHU :	Centre hospitalier universitaire
DAMP :	Damage associated molecular pattern
DSM :	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux)
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
FRQ-S :	Fonds de Recherche du Québec – Santé
GM-assessment:	General movement assessment
HMGB1:	High mobility group box 1
IAI:	Intra-amniotic inflammation
IL-1 :	Interleukine-1
IL-6 :	Interleukine-6
IL-8 :	Interleukine-8
IL-18 :	Interleukine-18
IQR:	Interquartile range

logMoM:	Logarithme du multiple de la médiane
MIAC:	« Microbial invasion of the amniotic cavity »
MMP-8 :	Matrice métalloprotéinase-8, « Matrix metalloproteinase-8 »
MoM :	Multiples de la médiane, « Multiples of the median »
OR :	Rapport de cote, « Odds ratio »
PARCA-R :	Parent Report of Children's Abilities – Revised
PPROM:	Preterm premature rupture of the membranes
PTB:	Preterm birth
PTL:	Preterm labour
RCIU :	Retard de croissance intra-utérin
ROC :	Receiver operating characteristics
RR :	Relative risk
SCP :	Société Canadienne de Pédiatrie
TNF- $\alpha$ :	Tumor necrosis factor alpha
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Emmanuel Bujold, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de superviser ma maîtrise, pour tout le support et les heures passées à diriger mes travaux, pour son enthousiasme contagieux, et pour toutes les opportunités qu'il m'a offertes de présenter et de faire connaître mes travaux de recherche.

Je souhaite également souligner la contribution des co-auteurs des articles : Amélie Tétu pour son travail scientifique et de coordination, et Dr Simon Gauthier, Dre Marianne Morand et Dre Fatiha Chandad pour leur expertise en santé dentaire.

Je remercie également toute l'équipe de recherche de Dr Bujold, particulièrement Amélie Tétu et Amélie Boutin pour leur travail rigoureux, et leurs multiples conseils, de même que tous les autres membres, incluant les infirmières de recherche sans qui le recrutement et la création de la base de données n'aurait pu être possible.

Je veux aussi remercier les organismes subventionnaires qui m'ont supportée au cours de ma maîtrise : les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), la Fondation du CHU de Québec, la Chaire de recherche en périnatalité Jeanne et Jean-Louis Lévesque, et le Centre de recherche en reproduction, développement et santé intergénérationnelle (CRDSI).

Ce projet a été financé par la Chaire de recherche en périnatalité Jeanne et Jean-Louis Lévesque, la Fondation Jeanne et Jean-Louis Lévesque, ainsi que les Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRQS; Bujold et al. 2009-2012).

Enfin, un merci spécial à mes parents, mes sœurs Marie-Camille et Éléonore, mon frère Raphaël, et Mathieu, pour leur support et leurs encouragements au quotidien.



## Avant-propos

Ce mémoire comprend deux articles dont je suis l'auteure principale. Le premier article, intitulé « *Periodontal Disease and Adverse Pregnancy Outcomes: A Prospective Study in a Low-Risk Population* » a été publié dans le *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* (JOGC) au mois d'avril 2016<sup>1</sup>. Cet article est signé par six autres auteurs. Dr Emmanuel Bujold, mon directeur de maîtrise, est médecin obstétricien gynécologue et chercheur au CHU de Québec ; il est boursier du *Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQ-S)*. Ses recherches se concentrent sur les complications de la grossesse et leurs impacts sur la santé maternelle et fœtale. Amélie Têtu est professionnelle de recherche au CHU de Québec. Dr Simon Gauthier et Dre Marianne Morand sont tous deux dentistes, et Dre Fatiha Chandad est professeure titulaire, vice-doyenne aux études supérieures et à la recherche et directrice du Groupe de recherche en écologie buccale. Dr Yves Giguère est médecin biochimiste et chercheur au CHU de Québec. Ses travaux portent sur le développement et l'évaluation de la performance de marqueurs biologiques précoces de complications de la grossesse.

Le second article, « *Subclinical intra-amniotic inflammation in the midtrimester and the subsequent development of abnormal gross motor skills in infants born either term or preterm* » est signé par Dr Emmanuel Bujold, Dr Yves Giguère, et Amélie Têtu. Cet article est actuellement en processus de publication.

Pour chacune de ces études, mon rôle consistait à la validation des données, à la catégorisation des variables et à l'analyse des données sous la supervision du Dr Bujold. De plus, j'ai effectué une revue de la littérature, rédigé la première version de l'article scientifique, et participé à la soumission après discussion et correction des co-auteurs. Seules des modifications mineures concernant les tableaux et les figures (adaptation au format du mémoire) ont été apportées aux deux articles.

---

<sup>1</sup> Soucy-Giguère L, Têtu A, Gauthier S, Morand M, Chandad F, Giguère Y, Bujold E. Periodontal Disease and Adverse Pregnancy Outcomes: A Prospective Study in a Low-Risk Population. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 2016 Apr;38(4):346-50.

# 1 Introduction

L'inflammation du liquide amniotique est un facteur de risque bien établi de complications de la grossesse, principalement de prématurité.(1) En effet, au moment de la rupture prématurée préterme des membranes ou du travail préterme, l'élévation de marqueurs inflammatoires intra-amniotiques est associée à un délai plus court avant l'accouchement.(2-9) Au moment de l'accouchement prématuré, l'inflammation du liquide amniotique s'associe à un risque plus élevé de complications en période néonatale.(3, 5, 9, 10) Également, l'inflammation amniotique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse entraîne une augmentation du risque d'accouchement prématuré.(11-17) Il semble que l'inflammation amniotique puisse être un processus qui débute tôt en grossesse. La cause exacte de cette inflammation demeure inconnue, bien que différentes hypothèses aient été émises. L'hypothèse actuellement la plus plausible est que l'inflammation amniotique est une réponse à un pathogène, souvent une ou plusieurs bactéries de la flore vaginale, ou encore à un stress cellulaire non infectieux. (4, 9, 10, 14, 15, 18, 19) Cependant, il a aussi été suggéré qu'une infection maternelle à distance de la cavité amniotique, telle une infection des voies respiratoires, du système digestif ou du parodonte puisse mener à une invasion microbienne de la cavité amniotique ou du placenta par dissémination hémotogène des pathogènes.(20-25). Une inflammation maternelle à distance pourrait également, par voie hémotogène, entraîner une inflammation maternelle systémique, et secondairement une inflammation amniotique.(26-28)

La maladie parodontale est une maladie inflammatoire du parodonte, c'est-à-dire les tissus qui supportent les dents, causée par la présence de microorganismes pathogènes.(29) Les vaisseaux sanguins du parodonte représentent une porte d'entrée vers la circulation sanguine pour les pathogènes et les molécules inflammatoires. En effet, la maladie parodontale est associée à une inflammation systémique : des bactériémies suite au brossage de dents ou autres procédures dentaires ont été rapportées. (30-33) Plusieurs auteurs ont observé un risque plus élevé de prématurité, de petit poids de naissance et de prééclampsie chez les femmes qui souffrent de maladie parodontale.(34-43) Toutefois, les études publiées sont souvent limitées par un devis rétrospectif, la présence de facteurs confondants non rapportés, et l'évaluation de la maladie parodontale au moment de l'accouchement plutôt qu'au début de la grossesse.(44-50) De plus,

l'association entre la maladie parodontale et l'inflammation intra-amniotique, bien qu'elle ait été suggérée, n'a pas été démontrée.(51, 52)

Il a été établi qu'une inflammation amniotique au moment de l'accouchement prématuré augmente le risque de paralysie cérébrale.(53-55) Toutefois, l'impact de l'inflammation amniotique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse sur le développement neurologique de l'enfant demeure inconnu. Il n'y a pas de recommandation clinique sur l'attitude médicale à favoriser lors d'une inflammation intra-amniotique ou d'une invasion microbienne de la cavité amniotique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse. L'impact de la présence intra-amniotique de cytokines inflammatoires sur le développement de l'enfant doit être étudié afin de permettre le développement de stratégies de prédiction et de prévention tôt en grossesse.

L'association entre la maladie parodontale et les complications de la grossesse doit être mieux étudiée afin de développer une approche individualisée en termes de prévention et de traitement visant à réduire les complications systémiques en lien avec l'inflammation parodontale. Finalement, l'impact de l'inflammation amniotique précoce sur le développement de l'enfant doit être étudié afin d'établir des stratégies de prédiction et de prévention efficaces.

## **1.1 Grossesse**

### **1.1.1 Généralités**

La grossesse est la période s'étalant de la date des dernières menstruations jusqu'à l'accouchement; sa durée moyenne totale est de 40 semaines, qui sont divisées en trois trimestres comptant chacun de 13 à 14 semaines. La grossesse se divise également en deux périodes distinctes: 1) la période embryonnaire, qui s'étend de la fécondation à la 8<sup>e</sup> semaine post-fécondation (donc la 10<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée), et durant laquelle a lieu l'organogénèse, et 2) la période fœtale, qui débute à la fin de la période embryonnaire jusqu'à l'accouchement, et qui se caractérise par la croissance et la maturation du fœtus. Un accouchement après 37 semaines de grossesse est considéré à terme; alors qu'avant 37 semaines, l'accouchement est considéré prématuré ou préterme.(56)

### 1.1.2 Embryon et fœtus

La grossesse débute par la fécondation, soit la fusion des gamètes produisant le zygote. Celui-ci se divise lentement et au moment où il se compose de 12-16 cellules, il atteint le stade de morula. Au 3<sup>e</sup> jour suivant la fécondation, la morula entre dans la cavité utérine, puis au 4<sup>e</sup> - 5<sup>e</sup> jour, les cellules qui la composent commencent à se différencier, marquant le stade du blastocyste. Deux pôles sont alors formés : un pôle embryonnaire, qui deviendra l'embryon puis le fœtus, et un pôle trophoblastique, qui deviendra le placenta. Au 7<sup>e</sup> jour, le blastocyste s'implante dans l'endomètre, c'est-à-dire la paroi interne de l'utérus. Entre le pôle embryonnaire et le pôle trophoblastique se forme la cavité amniotique, contenue par une membrane appelée l'amnios. Jusqu'à la fin de la 8<sup>e</sup> semaine post-fécondation, les organes de l'embryon se développent, chacun dans une fenêtre de temps bien précise.(56)

Le développement du cerveau débute durant la période embryonnaire.(57) Durant la 3<sup>e</sup> semaine post-fécondation, la première structure du système nerveux central, le tube neural, se forme, puis se referme entre le 25<sup>ème</sup> et le 27<sup>ème</sup> jour.(57) Le tube neural sera à la base du développement de toutes les structures du système nerveux.(58) Juste avant la fermeture du tube neural, à l'extrémité antérieure du tube, apparaissent trois vésicules cérébrales, qui se subdiviseront ensuite en cinq vésicules avant la fin de la période embryonnaire. Ces cinq vésicules formeront différentes structures du système nerveux central. À la fin de la période embryonnaire, les structures de base du système nerveux central sont établies, de même que les compartiments des systèmes nerveux central et périphérique.(57)

Durant la période fœtale, il y a une croissance rapide et une élaboration des structures entamées durant la période embryonnaire. Il y aura alors la production, la migration, et la différenciation des neurones. La production de neurones, ayant commencé au jour 42, se poursuit jusqu'à la mi-grossesse. Au fur et à mesure qu'ils sont produits, les neurones migrent, établissent de nouvelles connections et développent des réseaux. Après la naissance et au cours des années préscolaires, le cerveau continue à se développer, de sorte qu'à l'âge de 6 ans, sa taille atteint environ 95% de la taille adulte.(58) De nouvelles connections se forment rapidement au cours de la période post-natale, et continuent à se former jusqu'à l'adolescence.(57) Tant le fonctionnement adéquat des gènes régulant le développement cérébral que l'environnement sont nécessaires pour un développement cérébral adéquat.(57)

### 1.1.3 Placenta

Le placenta est l'organe permettant les échanges entre la mère et le fœtus et ainsi la croissance et le développement du fœtus tout au long de la grossesse. Il assure les fonctions respiratoires, digestives et rénales du fœtus. Le placenta se compose de deux faces : la face maternelle et la face fœtale. La face fœtale est recouverte par l'amnios. Sur la face maternelle du placenta se retrouvent les villosités chorales, qui permettent les échanges entre le sang maternel et le sang fœtal. En effet, le sang fœtal emprunte les deux artères ombilicales et est acheminé jusqu'aux villosités chorales. La face maternelle est accolée à l'endomètre. Le sang maternel arrive au placenta par les artères spiralées, puis se jette dans l'espace intervilloux. Les circulations sanguines maternelle et fœtale sont à proximité afin de permettre les échanges à travers une membrane semi-perméable, mais elles demeurent indépendantes.(59)

Le sang fœtal qui arrive dans les villosités chorales contient des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone, alors que le sang maternel qui se déverse dans l'espace intervilloux est riche en oxygène et en nutriments, tels des carbohydrates, des lipides et des acides aminés. À travers une membrane semi-perméable, les déchets fœtaux passent dans le sang maternel. Inversement, l'oxygène et les nutriments du sang maternel traversent dans le sang fœtal, et retournent au fœtus par la veine ombilicale. Ainsi, suite aux échanges, le sang fœtal est plus riche en nutriments et en oxygène et débarrassé de ses déchets.(56)

### 1.1.4 Liquide amniotique

#### 1.1.4.1 Fonction

Tout au long de la grossesse, le liquide amniotique constitue l'environnement immédiat de l'embryon puis du fœtus et joue plusieurs rôles qui permettent le développement optimal du fœtus. Il le protège des traumatismes et lui permet de bouger, ce qui est essentiel au développement musculo-squelettique. De plus, en permettant la déglutition et la respiration du fœtus, il participe au développement du tractus digestif et des poumons.(56) Enfin, la présence de cellules ayant une activité antimicrobienne favorise la défense du fœtus contre des bactéries, des virus, des parasites, et des champignons.(60)

Le liquide amniotique est utilisé à des fins diagnostiques durant la grossesse puisqu'il contient des cellules fœtales et puisque que certains biomarqueurs peuvent y être mesurés pour établir ou estimer le risque de pathologies fœtales telles que les anomalies du tube neural. Au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse, à l'aide d'un échantillon de liquide amniotique recueilli par amniocentèse, il est possible de détecter des anomalies génétiques et chromosomiques ou encore de suspecter la présence d'anomalies telles qu'un spina bifida. Enfin, au moment de la rupture prématurée préterme des membranes et/ou du travail préterme, soient les complications obstétricales menant à un accouchement prématuré spontané, l'amniocentèse peut être utilisée pour détecter la présence d'une infection amniotique, d'anomalies des marqueurs inflammatoires, et pour évaluer la maturation des poumons du fœtus (par estimation de la quantité de surfactant dans le liquide), ce qui permet d'orienter la prise en charge médicale.(60)

#### *1.1.4.2 Production*

La production et la composition du liquide amniotique varient au cours de la grossesse. Au début de la grossesse, le liquide amniotique provient du plasma maternel, qui atteint la cavité amniotique en passant par les membranes fœtales.(56, 60) Puis, grâce au développement du placenta et des vaisseaux du fœtus, de l'eau et des solutés en provenance du plasma maternel sont acheminés au fœtus. À partir du début du deuxième trimestre de la grossesse jusqu'à la 20<sup>e</sup> semaine de grossesse, le liquide amniotique est composé principalement du fluide extracellulaire fœtal, qui diffuse par la peau du fœtus.(60) À la 20<sup>e</sup> semaine de grossesse, la kératinisation de la peau du fœtus débute, ce qui diminue le passage du fluide extracellulaire. À partir de ce moment, le liquide amniotique est produit principalement par l'urine du fœtus. En effet, le système urinaire du fœtus est fonctionnel vers la 8<sup>e</sup> semaine de grossesse, et la déglutition est possible peu de temps après. Cependant, ce n'est qu'à partir de la deuxième moitié de la grossesse que l'urine fœtale représente une proportion importante du liquide amniotique.(56, 60) Finalement, une proportion du liquide amniotique demeure formée de plasma maternel filtré par le placenta, et de fluides d'origine pulmonaire, orale, nasale et trachéale.(60)

#### *1.1.4.3 Composition*

Au début de la grossesse, la composition du liquide amniotique est similaire au liquide extracellulaire fœtal. Puis, en raison de l'urine fœtale, qui représente une proportion plus importante du liquide

amniotique à partir de la 20<sup>e</sup> semaine de grossesse, on retrouve de l'urée, de la créatinine, et de l'acide urique en plus grande quantité. Enfin, d'autres éléments sont également présents dans le liquide amniotique : cellules fœtales desquamées, vernix, lanugo, et autres sécrétions.(60)

Étant donné sa fonction nutritive, le liquide amniotique contient divers éléments contribuant à la croissance fœtale, tels des carbohydrates, des protéines et des peptides, des acides aminés, des lipides, du lactate, du pyruvate, des électrolytes, des enzymes et des hormones. Afin d'apporter une protection antimicrobienne, on y retrouve également des enzymes et des peptides antimicrobiens, des neutrophiles et des macrophages, et des médiateurs pro-inflammatoires produits par ces derniers.(60)

## 1.2 Maladie parodontale

### 1.2.1 Définition et classification

La maladie parodontale comprend toutes les atteintes, acquises ou héréditaires, qui affectent le parodonte, c'est-à-dire les tissus qui soutiennent et supportent les dents. Cependant, le terme « maladie parodontale » est habituellement utilisé pour désigner la gingivite et la parodontite, qui sont deux problèmes inflammatoires causés par la présence de microorganismes pathogènes ou par la plaque dentaire.(29)

Il n'y a pas de consensus quant à une définition uniforme de la maladie parodontale. L'Académie Américaine de Parodontologie reconnaît les groupes suivants de maladie parodontale : maladie gingivale (induite par le tartre ou non induite par le tartre), parodontite chronique (localisée ou généralisée), parodontite agressive (localisée ou généralisée), parodontite comme manifestation d'une maladie systémique, maladie parodontale nécrosante, abcès du parodonte, parodontite associée à des lésions endodontiques, conditions et malformations développementales ou acquises.(61)

La gingivite est la forme la plus légère de maladie parodontale. Elle se caractérise par une inflammation des gencives, sans perte de tissus parodontal et se manifeste généralement par des saignements, particulièrement au brossage de dents.(29) Elle peut être induite par la plaque dentaire en association avec d'autres problèmes de santé comme la malnutrition ou la prise de certaines médications qui contribuent à son exacerbation.(61) La gingivite non induite par la plaque dentaire peut être causée par une multitude d'étiologies : infections bactériennes, virales ou fongiques, maladie génétique, maladie dermatologique, réaction allergique, réaction à des corps étrangers, traumatisme, etc.(61) La gingivite est réversible avec une bonne hygiène dentaire. Bien que mineure, elle doit être prise au sérieux, puisqu'elle peut progresser vers la parodontite.(29)

La parodontite est une forme plus sévère de maladie parodontale ; l'inflammation est plus importante, il y a une perte irréversible des tissus parodontaux, et des poches se forment dans le parodonte entre la dent et la gencive adjacente. Il y a également une perte d'attache clinique, soit la perte de tissus allant de la jonction ciment-émail jusqu'au fond de la poche parodontale. L'os alvéolaire, dans lequel les dents sont ancrées, peut aussi être atteint. La parodontite est initialement asymptomatique,



mais avec la progression de la maladie, elle se manifestera par de la douleur et de l'inconfort, une difficulté à la mastication, et des dents qui bougent et se déchaussent.(29)

La parodontite chronique est la forme de maladie parodontale la plus fréquente chez l'adulte. Elle se caractérise par la formation de poches dans le parodonte et par la régression de la gencive. Sa progression est habituellement lente à modérée, bien qu'il puisse y avoir des périodes de progression rapide. Plusieurs facteurs modifient sa progression, tels les maladies systémiques (ex : diabète), le tabagisme, et le stress. Des critères sont utilisés pour déterminer l'étendue et la sévérité de la maladie. Selon le pourcentage de sites atteints, on distinguera la parodontite chronique localisée ( $\leq 30\%$  des sites atteints) et la parodontite généralisée ( $> 30\%$  des sites atteints). Selon la profondeur des poches parodontales, on détermine la sévérité (légère : 1-2 mm ; modérée : 3-4 mm ; sévère : 5 mm et plus).(61)

La parodontite agressive se définit par une perte d'attache clinique et une destruction de l'os rapidement progressives. L'étendue de la maladie est déterminée par le nombre de dents atteintes : la parodontite agressive localisée n'atteint pas plus de deux dents autres que les premières molaires et incisives, alors que la parodontite agressive généralisée en atteint au moins trois.(61)

La maladie parodontale nécrosante inclue la gingivite ulcéralive nécrosante et la parodontite ulcéralive nécrosante ; il est fort probable que ces deux conditions soient en fait un continuum.(61, 62) La maladie parodontale nécrosante est fréquente chez les patients avec un virus d'immunodéficience humaine (VIH).(63) Les infections sont fréquentes et entraînent une perte d'attache progressive.(61)

L'abcès parodontal se présente généralement chez un patient qui souffre de parodontite chronique ou agressive. Le plus fréquemment, l'abcès survient dans un contexte d'exacerbation de la maladie dans une poche parodontale préexistante. On retrouvera alors de l'oedème et une douleur importante localisée.

La parodontite associée à des lésions endodontiques survient lorsqu'une lésion endodontique se draine par une poche parodontale préexistante.(61)

Enfin, certaines conditions de santé peuvent entraîner une maladie parodontale. En effet, la parodontite peut être une manifestation d'une maladie systémique, le plus souvent hématologique ou

génétique. Également, des conditions et déformations acquises ou développementales atteignant les dents ou les gencives peuvent entraîner ou exacerber une maladie parodontale.(61)

### 1.2.2 Pathogénèse

La maladie parodontale est habituellement causée par une infection bactérienne. Les bactéries présentes dans la cavité buccale adhèrent à la surface des dents, se multiplient et sécrètent une matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire sécrétée par les bactéries entraîne la formation d'un biofilm, c'est-à-dire un amas de bactéries enveloppées par une matrice et adhérant à une surface. Dans la cavité buccale, la formation d'un biofilm permet aux bactéries de coloniser la surface de la dent à laquelle elles ont adhéré. Ceci mène à la formation de la plaque dentaire, qui a un rôle important dans le développement de la maladie parodontale.(64)

En réponse à l'accumulation de plaque dentaire, l'hôte développe une réponse immunitaire et inflammatoire ; il y a production de molécules inflammatoires qui se propagent aux tissus parodontaux et entraînent leur destruction. De plus, les molécules inflammatoires attirent les leucocytes de la circulation sanguine vers les tissus ; ces leucocytes produiront à leur tour des molécules inflammatoires destinées à combattre les bactéries. La réponse immunitaire-inflammatoire de l'hôte vise à combattre l'infection. Cependant, l'inflammation chronique devient néfaste puisqu'elle contribue à la destruction des tissus parodontaux.(29)

### 1.2.3 Diagnostic et évaluation clinique

Le diagnostic des maladies parodontales est basé principalement sur les signes et symptômes cliniques; les radiographies peuvent aider à poser et à préciser le diagnostic.(61) L'outil employé dans l'évaluation de la maladie parodontale est la sonde parodontale, utilisée pour mesurer l'espace entre chaque dent et la gencive adjacente.(65)

Lors d'une évaluation clinique de maladie parodontale, la profondeur des poches parodontales est mesurée avec la sonde parodontale, à raison de quatre à six sites par dent. La perte d'attache clinique, définie comme distance entre la jonction cément-émail de la dent et le fond de la poche parodontale, est également mesurée. De plus, la présence de plaque dentaire, de calculs, et de saignement et d'exsudat gingival est évaluée. Un saignement provoqué par l'examen avec la sonde

indique qu'il y a présence d'inflammation. L'évaluation peut être complétée par des radiographies, pour évaluer la qualité et la quantité de l'os alvéolaire.(29)

Le diagnostic de la maladie parodontale est généralement basé sur la perte d'attache et sur la profondeur des poches parodontales. Cependant, il existe de nombreuses définitions et classifications de la maladie parodontale, et il n'y a pas de consensus sur des critères diagnostiques uniformes. De plus, les outils utilisés pour poser le diagnostic sont variables ; le type de sonde parodontale, et la méthode employée pour mesurer la perte d'attache et la profondeur des poches diffèrent d'une étude à l'autre.(66)

#### 1.2.4 Épidémiologie

La prévalence de la maladie parodontale varie grandement selon la population étudiée et selon les critères diagnostiques employés.(29, 67, 68) Une revue systématique incluant 72 études et 291 170 participants âgés de 15 ans et plus a déterminé que la parodontite sévère atteignait 11.2% de la population mondiale. La prévalence varie d'une région du monde à l'autre, allant de 4.2% en Océanie à 20.4% en Amérique du Sud.(69) Zuk et al, à l'aide des données recueillies par Statistique Canada, ont rapporté que 18% de la population adulte canadienne présentait une maladie parodontale modérée à sévère.(70)

#### 1.2.5 Effets de la maladie parodontale sur la santé

##### 1.2.5.1 Bactériémie et inflammation systémique

Qu'elle soit localisée au parodonte, la maladie parodontale entraîne des conséquences systémiques. Les poches parodontales constituent des portes d'entrée vers la circulation systémique pour les bactéries et les médiateurs inflammatoires locaux.(33) En effet, lors de procédures dentaires ou même du brossage des dents ou du passage de la soie dentaire, les bactéries responsables de l'infection localisée au parodonte peuvent entrer dans la circulation sanguine. Ceci entraîne une bactériémie, c'est-à-dire la présence de bactéries dans la circulation sanguine systémique.(30, 31) La maladie parodontale est également associée à une inflammation systémique.(32, 33) Les médiateurs inflammatoires produits localement peuvent être relâchés dans la circulation sanguine.(71) De plus, la présence de bactéries et de certains médiateurs inflammatoires qui

originent de l'infection et de l'inflammation localisée au parodonte entraînent la production de médiateurs inflammatoires à l'échelle systémique, entre autres, par l'endothélium et le foie.(32, 33)

#### 1.2.5.2 *Issues adverses de grossesse*

##### 1.2.5.2.1 Prématurité et petit poids de naissance

En 1996, Offenbacher et al. ont observé que la maladie parodontale était associée à un risque sept fois plus élevé de prématuré et de petit poids de naissance (<37 semaines et <2500 g).(72) Depuis, plusieurs études ont observé un risque plus élevé de prématurité et de petit poids de naissance chez les femmes qui souffrent de maladie parodontale.(34-38)

Il semble que l'association entre la maladie parodontale, la prématurité et le petit poids de naissance s'explique par la dissémination hématogène de bactéries et de médiateurs inflammatoires.(26) Des bactéries localisées au parodonte peuvent entrer dans la circulation sanguine et atteindre le placenta, le liquide amniotique ou le fœtus.(73-75) Blanc et al. ont observé que la présence de bactéries dans le placenta était normale, mais que chez les femmes ayant une parodontite, la quantité de pathogènes parodontaux était significativement plus importante.(73) Leon et al. ont rapporté l'invasion microbienne de la cavité amniotique par *P. gingivalis* chez huit patientes en travail préterme. Cette bactérie se retrouvait également dans la cavité orale de ces patientes, ce qui suggère que la dissémination hématogène de pathogènes parodontaux pourrait causer une infection amniotique entraînant un travail préterme ou une rupture prématurée des membranes.(74) Enfin, Han et al. ont détecté la présence de *F. nucleatum* (une bactérie anaérobie souvent présente dans la plaque dentaire) dans le placenta, les poumons, et l'estomac d'un enfant mort-né, ce qui indique que la dissémination hématogène de bactéries impliquées dans la maladie parodontale puisse entraîner une infection fœtale, qui augmenterait le risque de prématurité et de mort in utero.(75)

Le rôle de l'inflammation systémique secondaire à la dissémination hématogène des médiateurs inflammatoires du parodonte dans le développement du travail préterme ou de la rupture prématurée des membranes a également été évoqué. Toutefois, les études ont rapporté des résultats mitigés concernant cette association.(76-78) Enfin, l'inflammation systémique entraîne également des dommages placentaires, qui sont associés au retard de croissance intra-utérin et au petit poids de naissance.(26)

Le traitement de la maladie parodontale ne semble pas diminuer le risque de prématurité ou de petit poids de naissance.(79, 80) Selon Lopez et al., le traitement de la maladie parodontale diminue le risque de prématurité seulement s'il y a une réduction de l'inflammation locale et de la sévérité de la maladie.(81)

#### 1.2.5.2.2 Prééclampsie

La prééclampsie est une hypertension gestationnelle s'accompagnant d'une protéinurie ou d'un état indésirable ou d'une complication grave. Bien que la pathogénèse de la prééclampsie ne soit pas complètement élucidée, il est reconnu que différents facteurs immunologiques, infectieux, génétiques, placentaires, mènent à l'activation de l'endothélium. Cette activation de l'endothélium entraîne des complications cardiorespiratoires, neurologiques, rénales, hépatiques, et hématologiques chez la mère. De plus, les anomalies placentaires en lien avec la prééclampsie peuvent entraîner un retard de croissance intra-utérin.(82)

Plusieurs études ont observé une association entre la maladie parodontale et la prééclampsie.(38-43) La prééclampsie est associée à une activation de l'endothélium et la maladie parodontale s'accompagne d'une inflammation systémique.(32, 83) Ainsi, il semble plausible que la maladie parodontale augmente le risque de prééclampsie en exacerbant l'inflammation systémique.(26, 84)

## 1.3 Inflammation amniotique

### 1.3.1 Définition

L'inflammation est une réaction générée par le corps en réponse à une infection ou à un autre type d'insulte. Généralement, une réponse inflammatoire contrôlée est un mécanisme physiologique bénéfique; cependant, une réponse inflammatoire démesurée ou trop importante peut entraîner des conséquences néfastes comme un choc septique. En présence d'une infection, les cellules du système immunitaire qui se trouvent dans les tissus à proximité la reconnaissent et produisent des médiateurs inflammatoires qui entraînent une réaction inflammatoire locale. Les globules blancs présents dans la circulation sanguine seront attirés par cette réaction inflammatoire, vont migrer des vaisseaux vers les tissus infectés pour y combattre l'infection.(85)

L'inflammation amniotique se définit par une élévation des marqueurs inflammatoires amniotiques en réponse à une infection ou à un stress cellulaire.(86, 87) L'inflammation peut être associée à la présence de microorganismes ou stérile, auquel cas il y a élévation des marqueurs inflammatoire en l'absence d'évidence de microorganismes.(5, 6, 9, 10)

Bien que les caractéristiques cliniques des patientes avec inflammation amniotique stérile soient semblables à celles des patientes avec inflammation amniotique associée à la présence de microorganismes (risque de prématurité, complications néonatales, et court délai avant l'accouchement spontané), dans une étude publiée en 2014, Romero et al. ont noté certaines différences microbiologiques permettant de distinguer ces deux types d'inflammation chez les femmes en travail préterme; le décompte des leucocytes et du glucose se retrouvait dans les valeurs normales dans l'inflammation amniotique stérile, alors que l'inflammation amniotique associée à la présence de microorganismes s'accompagnait d'une élévation des leucocytes et d'une diminution du glucose. De plus, l'intensité de la réponse inflammatoire, mesurée par le taux d'IL-6, était plus faible dans le cas d'une inflammation amniotique stérile que dans le cas d'une inflammation associée à la présence de microorganismes.(10) Toutefois, ceci n'a pas été observé chez les femmes avec une rupture prématurée préterme des membranes.(5, 88)

### 1.3.2 Marqueurs inflammatoires

Les médiateurs inflammatoires peuvent se classer en sept groupes: amines vasoactives, peptides vasoactifs, fragments du complément, médiateurs lipidiques, cytokines, chimiokines et enzymes protéolytiques.(85)

De nombreux marqueurs inflammatoires ont été utilisés pour mesurer l'inflammation amniotique et de tenter de l'associer à la prématurité, aux complications néonatales, et aux conséquences neurologiques chez l'enfant, incluant l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, l'interleukine-8, l'interleukine-18, le TNF- $\alpha$ , la protéine C réactive, et la MMP-8.(2, 5, 9, 11, 12, 14-16, 53, 54, 89) Chez les patientes en travail préterme ou avec une rupture prématurée préterme des membranes et chez les patientes avec une amniocentèse génétique au 2<sup>e</sup> trimestre, les meilleurs prédicteurs pour les complications de la grossesse et néonatales semblent être la MMP-8 et l'IL-6 (voir section 1.1.7.1 Conséquences obstétricales).(90)

Afin de mesurer les marqueurs inflammatoires du liquide amniotique, une amniocentèse est nécessaire pour recueillir un échantillon de liquide amniotique. L'amniocentèse est une procédure qui peut augmenter le risque de rupture des membranes et de complications de la grossesse.(91, 92) Cet examen est utilisé au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse dans le cadre d'un dépistage/diagnostic prénatal, ou encore au moment d'un accouchement prématuré pour identifier une infection et/ou pour évaluer la maturité pulmonaire.(60) Étant donné la nature invasive de cet examen, la majorité des études s'intéressant à l'inflammation du liquide amniotique profitent de l'amniocentèse génétique au 2<sup>e</sup> trimestre ou de l'amniocentèse faite lors de l'accouchement prématuré pour collecter un échantillon de liquide amniotique à des fins de recherche.(3, 9, 11-16, 53, 54, 89)

### 1.1.5 Épidémiologie

Comme l'amniocentèse est une procédure réservée à certaines indications bien précises, la prévalence de l'inflammation amniotique au 2<sup>e</sup> trimestre chez les femmes asymptomatiques est difficile à évaluer. Gervasi et al., dans une étude prospective évaluant l'inflammation amniotique et les complications de la grossesse, ont observé que 6.3% des femmes ayant un accouchement à terme avaient présenté une inflammation amniotique subclinique démontrée par une élévation de l'IL-6 au moment de l'amniocentèse au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse.(11) La présence d'une inflammation amniotique précoce et subclinique n'est peut-être pas nécessairement une condition pathologique.

Chez les femmes en travail prématuré avec membranes intactes et chez les femmes avec rupture prématurée préterme des membranes, la prévalence d'infection et d'inflammation amniotiques est plus élevée.(18) Plus la rupture prématurée préterme des membranes ou le travail prématuré se manifeste tôt en grossesse, plus la prévalence de l'inflammation amniotique est élevée.(5, 9, 10) Romero et al. ont observé la présence d'inflammation amniotique ( $IL-6 \geq 2.6$  ng/mL) chez 57.6% des femmes ayant une rupture prématurée préterme des membranes et chez 37% des femmes en travail prématuré.(5, 10) Chez les femmes avec une rupture prématurée préterme des membranes, la prévalence d'inflammation amniotique stérile et d'inflammation amniotique associée à la présence de microorganismes était similaire, soit de 29% dans chacun des cas.(5) Toutefois, à un âge gestationnel moins avancé (<25 semaines), l'inflammation amniotique associée à la présence de microorganismes était significativement plus fréquente (64.3% contre 28.6%).(5) Chez les femmes en travail prématuré, l'inflammation amniotique stérile était plus fréquente que l'inflammation associée à la présence de microorganismes, et ce, peu importe l'âge gestationnel.(10)

#### 1.1.6 Causes

L'inflammation amniotique associée à la présence de microorganismes est secondaire à une réponse inflammatoire fœtale contre les pathogènes dans la cavité utérine.(9, 14, 15, 18) Quatre voies permettent aux microorganismes responsables de l'infection amniotique d'accéder à la cavité amniotique : (90, 93)

1) La voie ascendante : les microorganismes de la flore vaginale remontent jusqu'à la cavité utérine. Cette voie semble être la plus fréquente et la plus acceptée.(90, 93, 94) Bien que le bouchon muqueux soit une barrière efficace chez la majorité des femmes enceintes, le plus souvent, les pathogènes identifiés dans le liquide amniotique proviennent de la muqueuse vaginale: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, peptostreptococci, et des espèces de bactéroïdes.(20, 94)

2) La voie rétrograde : les microorganismes de la cavité abdominale accèdent à la cavité utérine via les trompes de Fallope.(20, 95)

3) La dissémination hématogène : les microorganismes présents à des sites à distance de l'utérus peuvent entrer dans la circulation sanguine et atteindre la cavité utérine. Certaines études ont



rapporté la présence de bactéries provenant de la flore buccale, ce qui supporte l'hypothèse que la dissémination hématogène joue un rôle dans le processus menant à l'infection amniotique.(20-23) Également, le *Listeria monocytogene*, une bactérie de la flore intestinale, et l'*Haemophilus influenza*, une bactérie se retrouvant dans les voies respiratoires, peuvent se disséminer par voie hématogène et entraîner une infection du liquide amniotique et du fœtus.(24, 25)

4) Les procédures invasives : des microorganismes peuvent être introduits accidentellement dans la cavité amniotique lors d'interventions invasives, telles l'amniocentèse et la cordocentèse (ponction de cordon ombilical). Bien que ce soit peu fréquent, des cas d'infection amniotique suite à l'amniocentèse ont été rapportés dans la littérature.(96-99)

La cause de l'inflammation amniotique stérile, quant à elle, n'a pas été élucidée, bien que plusieurs hypothèses aient été émises :

1) Des dommages tissulaires non-infectieux, tels la nécrose, l'ischémie, ou tout autre stress cellulaire, peuvent entraîner la production de molécules appelées *damage associated molecular pattern* (DAMPs).(19) Ces signaux d'alarme, lors de conditions physiologiques, sont inaccessibles aux cellules du système immunitaire ; toutefois, lors de stress, d'insultes cellulaires, ou d'infection, ils sont relâchés et ont la capacité d'induire une réponse inflammatoire similaire à la réponse inflammatoire qui se produit face à une infection.(19) Chez les femmes en travail prématuré ou avec une rupture prématurée préterme des membranes, l'inflammation amniotique stérile est associée à de plus hauts niveaux de *high mobility group box 1* (HMGB1), une molécule prototype de DAMPs, ce qui suggère que les DAMPs participent à l'inflammation amniotique stérile.(4, 10)

2) Une infection et/ou une inflammation maternelle systémique pourrait entraîner une inflammation amniotique. En effet, la maladie parodontale, une atteinte inflammatoire et/ou infectieuse des tissus supportant les dents, a été associée à des atteintes inflammatoires systémiques, incluant les complications de grossesse.(100) L'hypothèse que la dissémination hématogène de protéines pro-inflammatoires puisse entraîner une inflammation au niveau de l'interface fœto-maternelle a été émise, bien qu'une récente étude n'ait pu mettre en évidence de corrélation entre l'inflammation gingivale, sérique, et amniotique.(26-28)

3) Des microorganismes ayant envahi la cavité amniotique peuvent également avoir été combattus par le système immunitaire, puis demeurer dans la cavité amniotique dans un état non viable ; ces microorganismes, par la libération de facteurs chimiotactiques, pourraient causer un processus inflammatoire.(90)

4) Un microorganisme peut se retrouver dans la cavité amniotique sans être détecté par les méthodes utilisées, la sensibilité des techniques utilisées étant variable ; les méthodes de microbiologie moléculaire sont plus sensibles que la culture, mais une quantité suffisante d'ADN doit être présente, et la contamination peut fausser les résultats.(90) L'utilisation de méthodes moléculaires permet de détecter au moins 50% plus de femmes ayant une infection amniotique que la culture du liquide amniotique seule.(5, 101, 102)

Enfin, bien que la cavité amniotique ait longtemps été considérée comme un milieu stérile, de récentes études ont remis en question cette présomption.(103-105) Combs et al. ont d'ailleurs suggéré que la cavité amniotique est un milieu colonisé par des microorganismes, qui sont contrôlés par un faible niveau d'inflammation. Une perturbation de l'équilibre en place par une prolifération plus importante des microorganismes déjà présents ou par l'introduction d'un nouveau microorganisme entraînerait une réponse inflammatoire plus importante; cette hausse de l'inflammation amniotique serait responsable des complications obstétricales associées à l'infection et à l'inflammation amniotique.(9)

### 1.1.7 Conséquences

#### 1.1.7.1 Conséquences obstétricales obstétricales

L'inflammation du liquide amniotique, mesurée au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse ou au moment de l'accouchement prématuré, est associée à un risque plus élevé d'accouchement prématuré et à un délai plus court avant l'accouchement spontané.(1, 3, 5-9, 11-17, 106) L'accouchement prématuré peut être spontané, ou induit pour des raisons de santé maternelle et/ou fœtale. Deux évènements mènent à l'accouchement prématuré spontané : le travail prématuré avec membranes intactes et la rupture prématurée préterme des membranes. Les cytokines pro-inflammatoires entraînent la production de prostaglandines, qui entraînent des contractions utérines, et la production de médiateurs inflammatoires et d'enzymes dégradant la matrice, ce qui cause la rupture des membranes.(93)

La prématurité est un problème de santé mondial majeur : en 2010, 14.9 millions d'enfants sont nés avant terme, soit plus d'un enfant sur 10.(107) En Amérique du Nord 10.7% des enfants naissent prématurément, comparativement à 12.5% dans les pays les moins développés.(108) Malgré les avancées thérapeutiques, dans la majorité des pays, le taux de prématurité est à la hausse depuis 1990.(107) Les nouveau-nés prématurés, en raison de l'immaturité de certains organes, principalement les poumons, le cerveau, et le tube digestif, sont à risque de plusieurs complications en période néonatale telles la dysplasie bronchopulmonaire, le syndrome de détresse respiratoire néonatale, la leucomalacie périventriculaire, l'hémorragie intraventriculaire et l'entérocolite nécrosante. Par ailleurs, la prématurité est responsable de 75% des décès en période périnatale.(109) Enfin, les enfants nés prématurément ont davantage de problèmes du développement moteur et cognitif et de problèmes comportementaux.(109-113)

Au moment de la rupture prématurée des membranes ou du travail prématuré, la présence d'inflammation amniotique est associée à un plus court délai avant l'accouchement spontané.(3, 5, 7-9, 106) Chez les femmes en travail prématuré sans rupture des membranes, Combs et al. ont observé que la présence d'une inflammation amniotique sévère était associée à un accouchement imminent, soit un délai de moins de 2 jours, contrairement aux femmes qui n'avaient pas d'inflammation amniotique, qui accouchaient dans un délai d'environ 24 jours.(9) De plus, au moment de l'amniocentèse génétique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse, chez les femmes asymptomatiques, l'inflammation amniotique, est associée à une augmentation du risque d'accouchement prématuré spontané.(1, 11, 12, 14, 16, 17, 89) En effet, selon une étude par Kim et al., l'élévation de la MMP-8 au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse permet de prédire près de 50% des accouchements prématurés spontanés.(13)

Cependant, certaines femmes ont une inflammation amniotique subclinique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse et accouchent malgré tout à terme. En effet, dans une étude de cohorte incluant plus de 700 participantes, 84% des femmes avec une importante élévation de l'IL-6 accouchaient à terme. Cependant, chez ces participantes, le risque de complications autres que la prématurité (hypertension gestationnelle, prééclampsie, nouveau-né de petit poids pour l'âge gestationnel, décollement placentaire, placenta praevia) était plus élevé que chez les femmes avec des niveaux d'inflammation faibles.(11)

#### *1.3.2.1 Conséquences fœtales*

L'inflammation amniotique au moment de l'accouchement prématuré est associée au syndrome de réponse inflammatoire fœtale.(88, 114, 115) Le syndrome de réponse inflammatoire fœtale est une activation du système immunitaire inné du fœtus qui se traduit par une élévation de l'IL-6 dans le plasma fœtal.(114) Au niveau histologique, le syndrome de réponse inflammatoire fœtale se traduit par une inflammation du cordon ombilical et des vasculites chorioniques, c'est-à-dire une atteinte inflammatoire des vaisseaux sanguins qui se retrouvent dans le cordon ombilical et la face fœtale du placenta.(116)

La principale cause du syndrome de réponse inflammatoire fœtale est une infection de la cavité amniotique atteignant le fœtus. En effet, alors que l'infection atteint le fœtus, le système immunitaire inné de ce dernier s'active, et il s'ensuit une production de molécules pro-inflammatoires visant à contrôler la prolifération des microorganismes et à éliminer l'infection.(114) L'inflammation amniotique stérile, sans évidence d'invasion microbienne de la cavité amniotique, est également associée au syndrome de réponse inflammatoire fœtale.(115, 117)

La réponse inflammatoire systémique fœtale cible les systèmes hématopoïétique, endocrinien, cardiaque, pulmonaire, rénal, digestif, dermatologique, et cérébral du fœtus, ce qui peut entraîner plusieurs complications importantes, telles une dysfonction d'organes multiples, un choc septique et la mort fœtale dans certains cas, si l'accouchement n'est pas provoqué.(114) De plus, les nouveau-nés ayant souffert d'un syndrome de réponse inflammatoire fœtale ont un risque accru de morbidité à court terme, incluant le sepsis néonatal, le syndrome de détresse respiratoire, la pneumonie, l'hémorragie intraventriculaire, la leucomalacie périventriculaire et l'entéocolite nécrosante.(114, 118, 119) Enfin, le syndrome de réponse inflammatoire systémique est également associé à des séquelles neurologiques à long terme, notamment la paralysie cérébrale.(18, 114, 120)

#### *1.3.2.2 Néonatales*

Chez les femmes en travail prématuré ou avec une rupture prématurée préterme des membranes, l'inflammation amniotique stérile ou associée à la présence de microorganismes augmente le risque de complications néonatales, incluant le décès in utero ou néonatal, le syndrome de détresse respiratoire, la dysplasie bronchopulmonaire, l'hémorragie intra-ventriculaire, l'entéocolite nécrosante, et le sepsis néonatal.(5, 9, 10)

Au moment d'un accouchement prématuré, il semble qu'un traitement ciblé puisse diminuer les complications néonatales liées à l'infection ou à l'inflammation du liquide amniotique chez les nouveau-nés prématurés. Archabald et al. ont démontré que chez les femmes avec une rupture prématurée préterme des membranes, en présence d'une infection ou d'une inflammation du liquide amniotique, il est préférable de provoquer l'accouchement pour réduire la morbidité en période néonatale.(121) De plus, Lee et al. ont observé que chez les femmes avec une rupture prématurée préterme des membranes et une infection/inflammation amniotique, une antibiothérapie avec une meilleure couverture des germes fréquemment impliqués dans les infections amniotiques menant à la rupture des membranes, soient les anaérobies et les mycoplasmes génitaux, diminuait les complications néonatales, incluant l'hémorragie intra-ventriculaire.(122)

## 1.4 Troubles du neuro-développement

### 1.4.1 Définition

Les troubles du neuro-développement sont un groupe de troubles apparaissant au cours du développement de l'enfant, dont les premières manifestations apparaissent généralement au cours de la petite enfance, avant l'entrée à l'école. La caractéristique commune aux troubles du neuro-développement est un ou des déficits développementaux qui mènent à un dysfonctionnement au niveau social, personnel, académique, ou occupationnel. Le spectre des troubles du neuro-développement est très large, allant d'un trouble spécifique, à une atteinte neuro-développementale globale. Les troubles du neuro-développement se classifient en différentes catégories : déficit intellectuel, troubles de la communication, troubles du spectre de l'autisme, trouble du déficit d'attention avec ou sans hyperactivité, troubles moteurs, troubles spécifiques d'apprentissage, et autres troubles neuro-développementaux. La présence de caractéristiques propres à différents troubles neuro-développementaux chez un même enfant est fréquente.(123)

### 1.4.2 Épidémiologie

En 2001, au Canada, 1.1% des enfants âgés de 0 à 4 ans présentaient un retard de développement, défini comme étant un retard de développement physique, intellectuel ou d'un autre type.(124) Plusieurs études ont évalué la prévalence de différents troubles du neuro-développement décrits dans le *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*. La prévalence du déficit intellectuel est d'environ 1% dans la population générale; par contre, le déficit intellectuel sévère est moins fréquent, sa prévalence étant de 6 pour 1000.(125) De récentes études ont observé que la prévalence du trouble du spectre de l'autisme chez les jeunes âgés de cinq à neuf ans ainsi que chez les adultes se situait à environ 1%.(126, 127) Cette prévalence plus élevée que dans les études antérieures est possiblement expliquée par des changements dans les critères diagnostiques, une attention plus marquée aux signes et symptômes ou des différences dans la méthodologie des études.(123) Le trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité et les troubles spécifiques d'apprentissage ont une prévalence plus élevée. Selon une revue systématique incluant 102 études réalisées sur tous les continents, la prévalence mondiale du déficit d'attention avec hyperactivité est d'environ 5%. Cependant, d'un pays à l'autre, la définition et les critères diagnostiques du trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité varient grandement. Les études n'ayant pas utilisé

de critères diagnostiques précis rapportent une prévalence plus élevée que celles utilisant les critères du DSM.(128) En ce qui a trait aux troubles spécifiques d'apprentissage, aux États-Unis d'Amérique, environ 10% des jeunes en souffriront durant leurs 18 premières années de vie. Alors que la prévalence est d'environ 2% à l'âge de trois ans, elle augmente avec l'âge, atteignant 12 à 14% chez les jeunes de 10 à 17 ans.(129) Enfin, concernant les troubles moteurs, 1.8% des enfants âgés de sept ans ont un trouble sévère d'acquisition de la coordination, c'est-à-dire un retard sévère dans l'acquisition et l'exécution des mouvements de coordination motrice.(130)

### 1.4.3 Étiologie

Les causes d'un retard de développement peuvent être regroupées en quatre catégories : 1) prénatal intrinsèque, 2) prénatal extrinsèque, 3) périnatal, 4) postnatal.(131)

**Tableau 1.1. Catégories des causes de retard de développement**

Type	Origine
Prénatal intrinsèque	Maladie génétique
	Maladie métabolique
	Malformation du système nerveux central
Prénatal extrinsèque	Exposition à des toxines/agents tératogènes
	Infection
Périnatal	Asphyxie
	Prématurité
	Complications néonatales
Postnatal	Infection
	Psychosocial

---

## Traumatique

## Toxines

---

Source : Jimenez-Gomez et al.(131)

Les causes les plus fréquentes de retard de développement peuvent être classées en cinq grands groupes: l'asphyxie périnatale, les dysgénésies cérébrales, les anomalies génétiques, l'exposition à des toxines, et les causes psychosociales.(131) L'asphyxie périnatale est une perfusion cérébrale inadéquate, donc un apport insuffisant en oxygène au cerveau, qui est suivie par une acidose et la production de médiateurs inflammatoires et de radicaux libres. Des dommages cérébraux diffus s'ensuivent, et la résultante est une condition appelée encéphalopathie hypoxique-ischémique.(132) Dans trois études effectuées au Canada, parmi les enfants chez qui une cause était identifiée, l'asphyxie périnatale expliquait entre 15 et 22% des cas de retard de développement.(133-135) Les dysgénésies cérébrales, un groupe de malformations du tissu neurologique pouvant apparaître durant l'embryogénèse ou le développement fœtal, représentent également une proportion importante des causes identifiées de retard de développement.(131) La proportion représentée par cette étiologie variait entre 16 et 26% dans trois études Canadiennes.(133-135) Les maladies génétiques, dont le spectre est très large, font aussi partie des causes fréquemment identifiées.(131) Malgré des présentations cliniques fortement variées, les avancées dans ce domaine permettent d'établir de plus en plus fréquemment un diagnostic.(136) Le développement de l'enfant peut également être entravé par des facteurs psychosociaux, qu'ils soient volontaires (négligence, violence) ou involontaires (difficultés économiques, éducation parentale, etc).(131) L'abus de substances chez la mère durant la grossesse, telles l'alcool et les drogues, qui entraîne l'exposition du fœtus à des toxines, est également une cause de retard de développement global chez l'enfant, l'alcool étant la toxine la plus souvent rapportée au Canada.(131, 133) Enfin, dans les pays dotés d'un système de dépistage universel, les maladies métaboliques sont responsables d'une fraction minime des retards de développement.(131) Chez une importante proportion des enfants ayant un retard de développement, l'étiologie ne sera pas mise en évidence malgré les investigations effectuées.(131)



#### 1.4.4 Facteurs de risque

Certains enfants sont davantage à risque de présenter des problèmes de développement, de par certaines conditions biologiques et/ou environnementales.(137) Premièrement, les complications de la grossesse, principalement la prématurité et le petit poids de naissance sont des facteurs de risque bien établis de retard de développement chez l'enfant.(110-113, 138) La prématurité extrême (<28 semaines) est associée à un risque accru d'anomalies neuro-développementales, incluant la paralysie cérébrale, le retard de développement sévère, et le handicap sévère.(112) Également, David et al. ont observé que les enfants nés avant 28 semaines de grossesse ou dont le poids de naissance était inférieur à 1000g avaient un risque plus élevé de trouble d'acquisition de la coordination à l'âge de huit ans. Ce trouble d'acquisition de la coordination, bien que mineur, s'accompagnait de conséquences fonctionnelles, tels un retard cognitif et académique et des problèmes comportementaux.(110) De plus en plus d'études se sont intéressées à la prématurité modérée et tardive (32 à 36 semaines) et ont observé qu'elle était également un facteur de risque de retard de développement cognitif et moteur.(111, 113, 139)

Les problèmes de santé durant l'enfance sont également associés au neuro-développement. À titre d'exemple, les enfants souffrant de dysplasie broncho-pulmonaire, une complication pulmonaire de la prématurité, ont un risque plus élevé de retard de développement atteignant toutes les sphères, dont l'étiologie est le plus probablement multifactorielle (perturbation du développement cérébral, plus faible croissance, périmètre crânien plus petit, stress). D'ailleurs, la prise en charge multidisciplinaire, permettant un meilleur suivi et une diminution des hospitalisations réduit le risque de retard de développement.(140, 141) Les chirurgies cardiaques tôt après la naissance augmentent le risque de retard de développement. Une revue systématique a démontré que les enfants ayant eu une chirurgie pour une transposition des grands vaisseaux, une circulation univentriculaire fonctionnelle, ou diverses malformations cardiaques congénitales dans les six premiers mois de vie avaient des indices de développement mental cognitif et psychomoteur plus bas qu'attendu.(142) Majnemer et al. ont observé que les enfants ayant subi une chirurgie cardiaque dans les deux premières années de vie avaient à l'âge de cinq ans, un risque plus élevé d'anomalie au niveau neuromoteur et de quotient intellectuel dans la moyenne basse. De plus, 27% avaient des problèmes comportementaux.(143, 144) Les chirurgies majeures non cardiaques en période néonatale ont également été associées à un retard de développement cognitif et moteur fin et grossier à l'âge de deux ans.(145)

Enfin, les facteurs environnementaux ont une influence sur le neuro-développement des enfants. Dans une étude réalisée auprès d'enfants Canadiens âgés entre 1 et 5 ans, To et al. ont observé que les enfants dont la mère souffrait de dépression, dont la mère avait un faible niveau d'éducation, dont la mère était immigrante, qui habitaient dans un foyer avec un faible revenu avaient un risque plus élevé de retard de développement.(146)

#### 1.4.5 Dépistage

Actuellement, au Canada, il n'y a pas de méthode unifiée d'évaluation du développement des enfants.(147) Dans un communiqué publié en 2011, la Société Canadienne de Pédiatrie recommande l'évaluation systématique du développement de l'enfant lors de la visite de 18 mois. Cette visite, qui fait partie du programme d'immunisation, constitue fréquemment une des dernières visites médicales de routine avant l'entrée à l'école. Ainsi, la Société Canadienne de Pédiatrie souligne l'importance d'identifier et d'intervenir auprès des enfants qui présentent un retard ou qui sont plus vulnérables.(147) D'autres sont d'avis que la surveillance et le dépistage du développement de l'enfant devrait se faire entre neuf et 12 mois, en portant une attention particulière au développement moteur, qui est parfois le premier signe d'un trouble du neuro-développement.(148) Par exemple, un retard de l'acquisition des habiletés motrice peut être le premier signe d'un trouble du spectre de l'autisme et de paralysie cérébrale.(149, 150) Une étude effectuée au Danemark a d'ailleurs démontré que le diagnostic de paralysie cérébrale peut être posé avant l'âge de 12 mois dans 50% des cas, ce qui permet une intervention plus précoce.(149)

En contrepartie, le Canadian Task Force on Preventive Health Care ne recommande pas le dépistage du retard de développement chez les enfants âgés entre un an et quatre ans qui n'ont pas de facteurs de risque, et chez qui les parents et le médecin n'avaient pas d'inquiétude.(151) En effet, une revue systématique effectuée par ce même groupe a démontré que chez cette population, le dépistage à l'aide d'outils validés n'amène pas de bénéfice sur la santé des enfants.(152)

Les enfants à risque de retard de développement quant à eux, devraient assurément être suivis et dépistés par des outils validés.(153) La Société Canadienne de Pédiatrie encourage le dépistage à l'aide de questionnaires validés complétés par les parents tel le *Ages and Stages Questionnaire* (ASQ) et le *Parent Report of Children's Abilities-Revised* (PARCA-R) afin d'identifier les enfants avec un retard de développement plus rapidement, sans être trop coûteux. (147, 151)

#### 1.4.6 Infection et inflammation néonatale et développement neurologique

Les études ont démontré que chez les nouveau-nés prématurés, une infection importante en période néonatale est associée à une augmentation du risque de retard de développement; l'entérocolite nécrosante, le sepsis, et la méningite ont été associés à la paralysie cérébrale, au retard cognitif, au retard psychomoteur, et aux troubles de vision et d'ouïe chez les nouveau-nés prématurés et de très petit poids de naissance (<1000g).(154-160) Deux études ont effectué un suivi de l'enfant jusqu'à un âge plus avancé afin d'obtenir des résultats avec une prédiction plus fidèle des issues neurologiques à long-terme.(161, 162) Rand et al. ont observé que les enfants nés avant 32 semaines de grossesse qui avaient souffert d'une bactériémie, d'une infection urinaire, d'une méningite, ou d'une entérocolite nécrosante durant la période néonatale avaient un risque trois fois plus élevé de retard sévère du développement moteur et de trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité, ainsi qu'un risque deux fois plus élevé de retard du quotient intellectuel à l'âge de neuf ans.(161) Mitha et al., dans une étude incluant plus de 1700 enfants nés entre 22 et 32 semaines de grossesse et suivis jusqu'à l'âge de 5 ans, ont observé que les enfants qui avaient eu un sepsis néonatal à début précoce ou à début tardif avaient un risque 1.7 fois plus élevé de souffrir de paralysie cérébrale. Ce risque était plus élevé, chez les nouveau-nés ayant eu la combinaison d'un sepsis néonatal précoce et d'un sepsis tardif.(162)

Bien que moins étudiée, l'inflammation plasmatique en période néonatale a également été associée à un risque plus élevé de troubles du neuro-développement chez les enfants prématurés.(163, 164) Deux récentes études ont observé une association entre l'inflammation plasmatique chez les nouveau-nés prématurés et un développement neurologique anormal. Kuban et al., dans une étude de cohorte incluant 939 enfants nés avant 28 semaines de grossesse, ont observé que l'élévation persistante des marqueurs inflammatoires plasmatiques dans les deux premières semaines de vie était associée à la paralysie cérébrale. De plus, comme l'importance de la réponse inflammatoire, mesurée par le nombre de protéines inflammatoires dont la concentration était élevée, était corrélée au risque de paralysie cérébrale; un effet dose-réponse semble être présent.(163) Rose et al. ont observé que les nouveau-nés nés avant 32 semaines avec un poids de naissance inférieur à 1500 g, ceux dont la protéine C réactive était élevée dans les 2 premières semaines de vie obtenaient des

scores plus faibles à l'évaluation du développement moteur, cognitif et langagier à l'âge de 18 à 24 mois.(164)

#### 1.4.7 Infection et inflammation périnatale et développement neurologique

L'exposition du fœtus à une infection au moment de l'accouchement, incluant une chorioamnionite clinique ou histologique, la présence de bactéries dans le liquide amniotique et la fièvre maternelle, est un facteur de risque de complications neurologiques à court et à long terme chez l'enfant; il semble donc que l'étiologie du retard de développement chez certains enfants débute alors que le fœtus est encore dans l'utérus.(158, 165-178) La présence de bactéries dans le liquide amniotique au moment de l'accouchement prématuré est associée à un risque trois fois plus élevé de retard de développement neuromoteur et à un risque près de cinq fois plus élevé de paralysie cérébrale.(173) La chorioamnionite, une inflammation des membranes fœtales (chorion et amnios) généralement causée par une infection, est une complication fréquente au moment de l'accouchement prématuré. On l'appelle chorioamnionite clinique lorsque le diagnostic est basé sur les signes et symptômes cliniques, et chorioamnionite histologique lorsque le diagnostic est fait en pathologie, à l'analyse des tissus au microscope.(171) Cette complication infectieuse et inflammatoire de la grossesse a été largement étudiée, et les études ont démontré qu'elle entraîne un risque plus élevé de paralysie cérébrale chez l'enfant.(158, 166-168, 170, 175, 177, 178) Deux méta-analyses, publiées en 2000 et en 2010, ont confirmé cette association. Wu et al. ont observé que la chorioamnionite était associée à un risque de paralysie cérébrale 1.6 et 4.7 fois plus élevé chez les enfants nés avant terme et à terme respectivement, alors que Shatrov et al. ont observé un risque 2.4 fois plus élevé pour la chorioamnionite clinique et 1.8 fois plus élevé pour la chorioamnionite histologique.(167, 170) Bien que la majorité des études se soient intéressées aux enfants nés prématurément et de petit poids de naissance, une étude ciblant les enfants nés près du terme et à terme (>36 semaines), a rapporté que la chorioamnionite conférait un risque 4.1 fois plus élevé de paralysie cérébrale.(166) La chorioamnionite a également été associée à un retard de développement cognitif et à un retard du développement du langage chez les enfants nés prématurément et de petit poids de naissance.(169, 176)

Concernant l'inflammation plus spécifiquement, Yoon et al. ont observé une association entre des niveaux amniotiques élevés d'IL-6, d'IL-8, et de leucocytes au moment de l'accouchement prématuré et la paralysie cérébrale à l'âge de trois ans chez les enfants nés prématurément. Dans cette même

étude, la présence d'une inflammation du cordon ombilical, indiquant une réponse inflammatoire fœtale, était également associée à la paralysie cérébrale.(53) De façon similaire une augmentation de la MMP-8 amniotique au moment de l'accouchement prématuré était associée à une augmentation du risque de paralysie cérébrale à l'âge de trois ans.(54) Bien que le mécanisme par lequel l'inflammation augmente le risque de paralysie cérébrale soit inconnu, il semble que les cytokines inflammatoires puissent causer directement ou indirectement des lésions de la matière blanche.(55)

#### 1.4.8 Infection et inflammation durant la grossesse et développement neurologique

Quoique l'association entre l'exposition à l'inflammation amniotique durant la grossesse et le développement neurologique demeure peu documentée, quelques études ont démontré une association entre une infection maternelle ou de la fièvre maternelle au cours de la grossesse et un développement neurologique anormal chez l'enfant.(179-182) En effet, les infections génito-urinaires durant la grossesse sont associées à un développement moteur anormal, incluant la paralysie cérébrale chez les enfants, qu'ils soient nés préterme ou à terme.(179, 181, 183) Ahlin et al., en plus de confirmer l'association entre une infection maternelle en grossesse et la paralysie cérébrale chez les enfants nés à terme, ont observé que le risque de paralysie cérébrale était associé à la sévérité de l'infection, suggérant ainsi la présence d'un effet dose-réponse. Les infections mineures étaient associées à un plus faible risque de paralysie cérébrale de l'ordre de 4-5 fois plus élevé, alors qu'une infection maternelle sévère (chorioamnionite, pyélonéphrite) était associée à un risque 15 fois plus élevé de paralysie cérébrale.(182) Le mécanisme par lequel une infection maternelle peut entraîner des complications neurologiques chez l'enfant n'est pas élucidé. Toutefois, il semble plausible qu'une infection maternelle entraîne une inflammation amniotique, et que l'exposition prénatale à cette inflammation puisse causer des lésions cérébrales chez le fœtus.(179)

## **1.5 Hypothèse et objectifs**

### **1.5.1 Hypothèse**

Deux hypothèses ont été émises pour ce projet :

- 1) La maladie parodontale est associée à la prématurité spontanée, à la prééclampsie et à l'inflammation amniotique.
- 2) L'inflammation amniotique subclinique, au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse, est associée à un retard de développement chez l'enfant.

### **1.5.2 Objectifs**

Les deux objectifs principaux étaient :

- 1) Évaluer l'association entre la maladie parodontale et la prématurité, la prééclampsie et l'élévation de marqueurs inflammatoires (IL-6, MMP-8) amniotiques (chapitre 2).
- 2) Déterminer si l'inflammation amniotique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse est associée à un neurodéveloppement anormal chez les enfants nés à terme et prématuré.

## **2. Periodontal Disease and Adverse Pregnancy Outcomes: A Prospective Study in a Low-Risk Population**

Soucy-Giguère Laurence<sup>1</sup>, Tétu Amélie<sup>2</sup>, Gauthier Simon<sup>3</sup>, Morand Marianne<sup>3</sup>, Chandad Fatiha<sup>3</sup>, Giguère Yves<sup>4</sup>, Bujold Emmanuel<sup>5</sup>

1 Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec QC; Centre de recherche du CHU de Québec, Quebec QC

2 Centre de recherche du CHU de Québec, Quebec QC.

3 Faculty of Dentistry, Université Laval, Quebec City QC.

4 Centre de recherche du CHU de Québec, Quebec QC; Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec QC

5 Centre de recherche du CHU de Québec, Quebec QC; Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec QC

## 2.1 Résumé

La maladie parodontale a été associée à une inflammation systémique et à une augmentation de complications de la grossesse, dont la prééclampsie et la prématurité. Notre objectif était de déterminer si la maladie parodontale présente au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse était associée à la prééclampsie, à la prématurité et à l'inflammation intra-amniotique dans notre population. Une étude de cohorte prospective a été réalisée auprès de femmes enceintes ayant eu une amniocentèse génétique entre la 15<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> semaine de grossesse. L'inflammation du liquide amniotique et la santé parodontale étaient évaluées au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse.

Parmi 273 participantes, la maladie parodontale était associée à un risque 5.9 fois plus élevé de prééclampsie, ce qui suggère que la maladie parodontale puisse participer aux mécanismes pathophysiologique de ce syndrome obstétrical. Nous n'avons pas observé que la maladie parodontale était associée de façon statistiquement significative à la naissance prématurée spontanée, ni à l'inflammation intra-amniotique.



## 2.2 Abstract

**Background:** Periodontal disease has been associated with systemic inflammation and adverse pregnancy outcomes, including preeclampsia and preterm birth.

**Objective:** To examine the relationship between periodontal disease in early pregnancy and the risk of amniotic inflammation, preterm birth, and preeclampsia.

**Methods:** We performed a prospective cohort study of women undergoing amniocentesis for fetal karyotype between 15 and 24 weeks' gestation. Participants underwent periodontal examination by a certified dentist, and a sample of amniotic fluid was collected. Periodontal disease was defined as the presence of one or more sites with probing depths  $\geq 4$  mm and  $\geq 10\%$  bleeding on probing. Matrix metalloproteinase-8 and interleukin-6 concentrations in the amniotic fluid were measured. Medical charts were reviewed for perinatal outcomes. Univariate and multivariate logistic regression analyses were used to assess the association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes.

**Results:** We recruited 273 women at a median gestational age of 16 weeks (range 15 to 24), and 258 (95%) agreed to undergo periodontal examination. Periodontal disease was observed in 117 of the participants (45%). We observed no significant association between periodontal disease and preterm birth (relative risk [RR] 2.27; 95% CI 0.74 to 6.96) or spontaneous preterm birth (RR 0.90; 95% CI 0.20 to 4.11). However, women with periodontal disease were more likely to develop preeclampsia, and this association remained significant after adjustment for potential confounders (adjusted RR 5.89; 95% CI 1.24 to 28.05). Periodontal disease was not associated with significant differences in the intra-amniotic concentration of matrix metalloproteinase-8 ( $13.0 \pm 46.6$  vs  $5.7 \pm 10.4$  ng/mL,  $P = 0.098$ ) or interleukin-6 ( $3.3 \pm 20.3$  vs  $1.0 \pm 1.6$  ng/mL,  $P = 0.23$ ), although a non-significant trend was observed.

**Conclusion:** Periodontal disease is associated with preeclampsia but not with spontaneous preterm birth. The current study cannot exclude an association between periodontal disease and intra-amniotic inflammation.

## 2.3 Introduction

Periodontal disease is a group of inflammatory diseases of the periodontal tissues, the tissues supporting the teeth, and encompasses gingivitis and periodontitis.(184) It is one of the most common chronic infectious diseases; worldwide, its prevalence varies between 10% and 90%, depending on the population studied and the diagnostic criteria used.(29, 185) Although the disease is localized to the periodontal tissues, it has been reported to have a role in several systemic conditions and chronic diseases, such as atherosclerotic disease and diabetes.(100, 186) Periodontal disease has also been associated with adverse pregnancy outcomes, including preterm birth and preeclampsia.(44, 187) However, most studies have been limited by their retrospective design and analyses, the presence of uncontrolled or inadequately reported confounders, or by the fact that periodontal examinations were performed after delivery.(44-49) Physiologic changes during pregnancy include an increase in maternal serum estrogen and progesterone levels, increased vascular permeability, and changes in the immune system, and these are believed to contribute to the progression of periodontal disease to a more severe state during pregnancy.(84, 188)

The specific pathogenesis explaining the association between periodontitis and adverse perinatal outcomes is still unknown. It has been hypothesized that preterm birth could be the result of direct translocation of pathogens from the oral flora to the placenta or to the amniotic cavity.(21, 22, 74) This could result in intrauterine infection and inflammation, which have been established as major risk factors for preterm birth.(20) Indeed, increased intra-amniotic interleukin-6 has been associated with a 4.5-fold increase in the risk of spontaneous preterm delivery.(1) Moreover, Yoon et al. found that elevated intra-amniotic IL-6 and matrix metalloproteinase-8 levels at the time of mid-trimester amniocentesis are associated with spontaneous preterm birth before 32 weeks of gestation.(16) Periodontal disease could also result in the production of pro-inflammatory cytokines; these cytokines, originating from the crevicular fluid, can gain access to the systemic circulation and cause endothelial lesions and systemic inflammation, resulting in an increased risk of developing preeclampsia and preterm birth.(100, 189, 190)

In this context, we aimed to evaluate the association between periodontal disease and preterm birth, preeclampsia, and the intra-amniotic pro-inflammatory markers MMP-8 and IL-6.

## 2.4 Methods

This was an ancillary study of a prospective cohort of pregnant women recruited at the CHU de Quebec between December 2006 and June 2010. Women between 15 and 24 weeks' gestation who

were undergoing amniocentesis for fetal karyotype were invited to participate. The exclusion criteria for the prospective study were the presence of regular uterine contractions, premature rupture of membranes, multiple pregnancies, lethal congenital anomalies, fetal aneuploidy, and maternal age under 18 years. All women who were recruited gave written, informed consent before amniocentesis. At the time of amniocentesis, a sample of amniotic fluid was collected for research purposes in addition to amniotic fluid sampling for clinical testing. Eligible women were invited to participate in the ancillary study that involved periodontal examination by two certified dentists in the seven days following amniocentesis. The examination included full mouth probing (except wisdom teeth) with an automated periodontal probe (Florida Probe Corp., Gainesville, FL) at six sites per tooth. For the purpose of the current study, periodontal disease was defined according to the Offenbacher criteria for moderate to severe periodontal disease: these include the presence of at least one site with probing depths  $\geq 4$  mm and  $\geq 10\%$  bleeding on probing.<sup>(191)</sup> Amniotic fluid MMP-8 and IL-6 concentrations were measured using a specific immunoassay according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). The detection limits of MMP-8 and IL-6 were 0.02 ng/mL and 0.70 pg/mL, respectively. The inter-assay coefficient of variation was  $< 10\%$  and the intra-assay coefficient of variation was 8% for both MMP-8 and IL-6. Maternal medical records were reviewed after delivery for the presence of adverse pregnancy outcomes, including preterm birth (delivery before 37 completed weeks of pregnancy) and preeclampsia.

The association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes was reported as relative risk with 95% confidence intervals, calculated using univariate and multivariate logistic regression analyses that were adjusted for smoking status and BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup>. MMP-8 and IL-6 amniotic fluid concentrations in women with and without periodontal disease were compared using the Mann-Whitney test. A *P*-value  $< 0.05$  was considered significant.

The project was approved by the Ethics Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec.

## **2.5 Results**

We recruited 273 women for the study, and of these 258 (95%) agreed to have a complete periodontal examination. Maternal characteristics and details of amniocentesis and periodontal disease are shown in Table 2.1. One hundred and seventeen participants (45%) had periodontal disease, 14 (5.4%) had a preterm birth, seven (2.7%) had a spontaneous preterm birth, and 11 (4.3%) developed preeclampsia. Periodontal disease was not associated with a significant risk of preterm birth (relative risk 2.27; 95% CI 0.74 to 6.96) or spontaneous preterm birth (RR 0.90; 95% CI

0.20 to 4.11), but it was associated with an increased risk of preeclampsia (RR 5.79; 95% CI 1.23 to 27.36,  $P = 0.02$ ). The association between periodontal disease and preeclampsia remained significant after adjustment for potential confounders (Table 2.2). Of note, all five cases of preterm preeclampsia were observed in women with periodontal disease ( $P = 0.01$ ).

Finally, we observed that mean amniotic fluid concentrations of MMP-8 and IL-6 were two to three times higher in women with periodontal disease ( $13.0 \pm 46.6$  ng/mL and  $3.3 \pm 20.3$  ng/mL, respectively) than in women without periodontal disease ( $5.7 \pm 10.4$  ng/mL and  $1.0 \pm 1.6$  ng/mL, respectively), but these differences were not statistically significant ( $P = 0.098$  and  $P = 0.23$ ).

## 2.6 Discussion

We found a significant association between periodontal disease diagnosed in early pregnancy and the risk of preeclampsia, particularly preterm preeclampsia. However, we did not find an association between periodontal disease and spontaneous preterm birth. Finally, we did not find a significant association between periodontal disease and intra-amniotic markers of inflammation (MMP-8 and IL-6). Our observations suggest that preterm preeclampsia could be the main contributor of preterm birth in women with periodontal disease.

Our observations are similar to those in a case-control study conducted in France that found no association between periodontitis and preterm birth but an association between generalized periodontitis and induced preterm births for preeclampsia (adjusted odds ratio 2.46; 95% CI 1.58 to 3.83).<sup>(48)</sup> Our findings are also in agreement with a meta-analysis that reported an increased risk of preeclampsia in the subgroup of women who had periodontal disease before 32 weeks' gestation (OR 3.69; 95% CI 2.58 to 5.27).<sup>(192)</sup> We did not find a significant association between periodontal disease and preterm birth, but our RR of 2.3 (95% CI 0.7 to 7.0)—although not statistically significant, possibly because of limited statistical power—was in the range of reported RRs (from 1.7 to 4.3) from previous meta-analyses.<sup>(187, 193-195)</sup> A multicentre case-control study conducted in Quebec reported no significant association between periodontal disease and preeclampsia (aOR 0.96; 95% CI 0.59 to 2.17), but in that study periodontal disease was diagnosed after delivery, rather than early in pregnancy.<sup>(49)</sup> In other studies that evaluated the risk of periodontal disease associated with intra-amniotic infection or inflammation, Goepfert et al. reported no association between periodontal disease and histologic chorioamnionitis, funisitis, or the level of IL-6 in umbilical cord blood.<sup>(45)</sup> Ercan et al. reported three cases of asymptomatic women with preterm labour and low birth weight in whom periodontal pathogens were found in mid-trimester amniotic fluid.<sup>(23)</sup> Gauthier et al. reported three

cases of women with preterm labour and intact membranes with amniotic sludge that grew ***Fusobacterium nucleatum*** on culture, with a similar strain found in oral cultures from the women or their partners.(21) We could not identify any previous study that evaluated the correlation between periodontal disease and intra-amniotic inflammation.

Our study is limited by its sample size and the low rates of adverse perinatal outcomes. We were therefore unable to detect small changes in RR. The two- to three-fold increase in the concentrations of both IL-6 and MMP-8 in the amniotic fluid of women with periodontal disease suggests a positive association, but the wide distribution of those concentrations across the participants precludes drawing any conclusion. In addition, the diagnostic criteria used to define moderate to severe periodontal disease (Offenbacher categories 4 and 5) may lack specificity because 45% of the participants experienced periodontal disease.(191) We could not estimate a dose-response effect with only five cases classified as category 5.

Two main hypotheses have been suggested to explain the pathogenesis behind the potential association between periodontal disease and preterm birth. Oral pathogens could enter the systemic circulation and access the placenta, resulting in intrauterine infection.(21, 22, 74) It has also been suggested that cytokines from the crevicular fluid could enter the systemic circulation and access the placenta, inducing intra-amniotic inflammation.(100, 189, 190) Infection and inflammation are well-established risk factors for spontaneous preterm birth, which makes both hypotheses plausible.(93) However, although infection at the time of delivery is often present in preterm births occurring before 30 weeks' gestation, only a small proportion of these infections are believed to be caused by oral pathogens.(20, 196) Usually, the identified pathogens found in the amniotic fluid of women who experience spontaneous preterm birth originate in the vaginal mucosa.(20, 93) The inconsistencies between studies that have investigated the potential pathogenetic associations between periodontal disease and spontaneous preterm birth make the causative role of periodontal disease questionable. However, recent meta-analyses suggested that prophylactic measures such as use of mouthwash or antibiotics could potentially reduce the rate of preterm birth.(197, 198)

The role of systemic inflammation in preeclampsia has been demonstrated; indeed, this obstetric condition is characterized by generalized maternal endothelial dysfunction, believed to be the result of an exaggerated maternal inflammatory response.(199) In a systematic review, Rustveld et al. noted an association between preeclampsia and maternal viral or bacterial infection, including urinary tract infections and infections with human cytomegalovirus, adeno-associated virus-2, herpes simplex virus-2, ***Epstein-Barr virus***, and ***Chlamydia pneumoniae***, which led them to hypothesize that production of pro-inflammatory cytokines in response to an infectious agent contributes to systemic

inflammation and increases the risk of developing preeclampsia.(200) Periodontal disease results in the production of pro-inflammatory cytokines, and it has been suggested that these cytokines could gain access to the systemic circulation and participate in the systemic inflammation, cause endothelial lesions, and contribute to the development of preeclampsia.(100) It has also been suggested that the release of infectious agents into the systemic circulation could increase the risk of developing uteroplacental atherosclerosis.(200) Finally, it has been hypothesized that maternal infection could have a direct effect on cytotrophoblast cells, which would lead to inadequate invasion of the uterine spiral arteries.(200) According to these hypotheses, it would be important to evaluate the relationship between periodontal disease and surrogate markers of deep placentation disorders and preeclampsia, such as uterine artery Doppler velocimetry and serum levels of pregnancy-associated plasma protein A and placental growth factor.

The major strengths of the current study include its prospective design and the periodontal examination performed in early pregnancy (between 15 and 23 weeks' gestation) before the clinical expression of the adverse pregnancy outcomes, decreasing the risk of observation bias. Indeed, physiologic changes occurring during pregnancy are believed to lead to a change in oral flora and to a progression in the severity of gingival inflammation and periodontal disease.(188, 201, 202)

## **2.7 Conclusion**

We found that periodontal disease diagnosed in early pregnancy is associated with a significant increase in the risk of preeclampsia but not spontaneous preterm birth or intra-amniotic inflammation. However, our study had limited statistical power, and a type 2 error in our findings cannot be excluded. Further studies should evaluate the role of prophylactic measures, such as daily mouthwash, on the incidence of preeclampsia in women found to have periodontal disease in early pregnancy. A study with a larger sample size is required to estimate the impact of periodontal disease on intra-amniotic inflammation.

**Table 2.1. Characteristics of the participants**

Characteristic	Median (range)
Maternal age, years	35 (19 to 45)
Body mass index kg/m <sup>2</sup>	25 (17 to 49)
Caucasian	242 (94%)
Parity	
Nulliparous	90 (35%)
Multiparous	164 (64%)
Missing data	4 (2%)
Gestationnal age at amniocentesis, weeks	16 (15 to 24)
Offenbachers's category(191)	
Category 1	63 (24%)
Category 2	16 (6%)
Category 3	62 (24%)
Category 4	112 (43%)
Category 5	5 (2%)
Periodontal disease (category 4 or 5)	117 (45%)

Data are reported as median (range) or n (%)

**Table 2.2. Multivariate regression analysis for factors related to preeclampsia**

	Relative risk	95% Confidence interval
Periodontal disease	5.89	1.24 to 28.05
Current smoking	1.20	0.14 to 10.18
BMI	4.18	<b>2.8 o 22.55</b>



### **3. Midtrimester subclinical intra-amniotic inflammation and subsequent development of abnormal gross motor skills in infants born either term or preterm**

Laurence Soucy-Giguère<sup>1</sup>, Amélie Tétu MSc<sup>1</sup>, Isabelle Marc<sup>1,2</sup>, Yves Giguère MD PhD<sup>1,3</sup>, Emmanuel Bujold MD MSc<sup>1,4</sup>

1 Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, Canada

2 Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Canada

3 Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Canada

4 Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Canada

### 3.1 Résumé

L'inflammation intra-amniotique est retrouvée fréquemment chez les femmes en travail prématuré et constitue un risque important de paralysie cérébrale. Cette inflammation peut être présente plusieurs semaines avant les signes et symptômes faisant craindre une naissance prématurée. L'objectif était d'explorer l'association entre l'inflammation amniotique précoce et le développement neurologique de l'enfant. Une cohorte prospective de femmes ayant une amniocentèse génétique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse a été constituée. Les niveaux d'IL-6 et de MMP-8 étaient mesurés sur des échantillons de liquide amniotique prélevés au moment de l'amniocentèse. Les issues de grossesses ont été collectées sur les dossiers médicaux et le développement de l'enfant a été évalué à 18 mois d'âge corrigé à l'aide du test de l'ASQ. La corrélation entre la sévérité de l'inflammation amniotique et la sévérité du retard développemental a été estimée.

Parmi 709 paires mère-enfant, nous avons observé que le risque de retard moteur était plus que doublé avec un  $\log\text{MMP-8} > 1.09$  MoM ou un  $\log\text{IL-6} > 1.10$  MoM, et ce même après exclusion des enfants nés prématurément. Finalement, l'inflammation amniotique importante était associée aux atteintes neurologiques sévères.

Une inflammation amniotique précoce peut affecter jusqu'à 3% des grossesses; augmenter le risque de naissance prématurée, mais également le risque d'atteinte neuro-développementale, plus particulièrement la motricité grossière.

## 3.2 Abstract

**Background:** Intra-amniotic inflammation (IAI) is an important risk factor for preterm birth and for adverse neonatal outcomes in women with spontaneous preterm labor.

**Objective:** To estimate the impact of subclinical midtrimester IAI in asymptomatic women on infants' neurologic outcomes at 18 months.

**Methods:** We performed a prospective cohort study of women undergoing midtrimester amniocentesis for fetal karyotype. Amniotic fluid samples were tested for IL-6 and MMP-8 concentrations using ELISA, which were reported as multiples of median (MoM) after log transformation and adjustment for gestational age. Infant neurodevelopment was evaluated at 18 months using the *Ages and Stages Questionnaire* (ASQ), including evaluation of five categories of neurodevelopment: communication, gross motor skills, fine motor skills, problem solving, personal-social skills. Non-parametric and multivariable regression analyses, reported as relative risk (RR) with their 95% confidence intervals (CI), were used to estimate the association between IAI and infants' outcomes considering potential confounders, including birthweight, gestational age at delivery and infant's corrected age at ASQ.

**Results:** Out of 1406 participants, complete follow-up was obtained for 709 (50%) recruited at a median gestational age of 17.3 (range: 14 – 24) weeks. We observed no significant association between IAI and four of the five ASQ categories. However, MMP-8 ( $p < 0.05$ ) and IL-6 ( $p = 0.05$ ) were associated with abnormal gross motor skills at 18 months. After adjustment for confounders,  $\log\text{MMP-8} > 1.09$  MoM (RR: 2.33; 95%CI: 1.24 - 4.36) and  $\log\text{IL-6} > 1.10$  MoM (RR: 2.66; 95%CI: 1.43 - 4.95) were both associated with a greater risk of abnormal infant gross motor skills. The association remained significant for term births only ( $\log\text{IL-6} > 1.10$  MoM, RR: 2.08; 95%CI: 1.06 - 4.12). Finally, high IL-6 concentration ( $> 1.125$  log MoM) was associated with severe disorder (failure of 4 to 5 ASQ categories; RR: 4.57; 95%CI: 1.01– 20.79).

**Conclusion:** Midtrimester subclinical IAI is a risk factor for neurodevelopmental disorders, even in infants born at term.

### 3.3 Introduction

Intra-amniotic inflammation (IAI) in women with preterm labour (PTL) or preterm premature rupture of the membranes (PPROM) is associated with early gestational age at delivery, adverse perinatal outcomes and spontaneous preterm birth.(3, 5, 8-10) Preterm birth is the leading cause of perinatal mortality, and the second most frequent cause of death among children aged 5 years-old and under worldwide; additionally, infants born preterm are at higher risk of neonatal morbidities and long-term adverse neurologic and developmental outcomes, including motor and cognitive development delay.(107, 109-113, 203)

There is compelling evidence that perinatal IAI and microbial invasion of the amniotic cavity (MIAC) are associated with adverse neurologic outcomes in preterm infants.(54, 167, 170, 172, 173, 204, 205) Chorioamnionitis is among the main risk factors of neonatal encephalopathy, as well as long-term neurologic sequelae, mainly cerebral palsy.(158, 165-167, 170, 174, 206) Furthermore, the fetal inflammatory response syndrome and fetal exposure to elevated amniotic fluid concentrations of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) are associated with an increased risk of cerebral palsy in preterm neonates, suggesting that both IAI and the fetal inflammatory response contribute to neuronal damage.(53) Similarly, an elevated amniotic fluid concentration of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is associated with an increased risk of cerebral palsy in preterm infants.(54)

IAI can be present early in gestation and is associated with adverse pregnancy outcomes.(11, 207) Subclinical midtrimester IAI in asymptomatic women is associated with subsequent preterm birth.(11, 14-16, 89, 208) However, a significant proportion of women with midtrimester IAI will undergo a normal pregnancy with term delivery.(11) Although IAI has previously been associated with adverse neurologic outcomes in women with PTL or PPRM, the clinical significance of subclinical midtrimester IAI in women who will subsequently deliver at term is unknown.(53-55)

We aimed to determine whether subclinical midtrimester IAI is associated with neurodevelopmental outcome of infants born either term or preterm.

### 3.4 Methods

We performed a prospective cohort of women undergoing midtrimester amniocentesis at the CHU de Québec, Canada, between January 2008 and June 2010. Pregnant women were invited to participate if they were asymptomatic and undergoing amniocentesis for fetal karyotype between 14 and 24 weeks of gestation. Exclusion criteria were: oligohydramnios, regular uterine contractions, premature rupture of the membranes, multiple pregnancies, lethal congenital anomalies, and maternal age below 18 years old. Participants who were lost to follow-up after delivery and those with fetal aneuploidy were excluded from the analysis. Written informed consent was obtained before amniocentesis. The project was approved by the Ethics Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec.

Demographic data, medical and obstetrical history were collected on the day of recruitment. At the time of amniocentesis, a sample of amniotic fluid was collected for research purposes. The concentration of interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) were measured by ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). The detection limits of IL-6 and MMP-8 were 0.70 pg/mL and 0.02 ng/mL, respectively. For MMP-8, the coefficients of variation (CV) of intra-assay and inter-assay precision were 6.2% and 8.9% respectively. For IL-6, the CV of intra-assay and inter-assay precision were 5.7% and 5.6% respectively. IL-6 and MMP-8 were reported in multiples of median adjusted for gestational age after log transformation to obtain normal distribution.

Pregnancy outcomes were obtained from review of the medical records and completed by postal questionnaire for participants who delivered in non-participating centers. Pregnancy outcomes included gestational age at birth and birth weight. Participants were contacted by mail and asked to complete the “Ages and Stages Questionnaire (ASQ) 2<sup>nd</sup> edition” when the infant was 18 months old or 18 months old of corrected age for those who were born preterm. The ASQ is a validated parent-completed neurodevelopmental evaluation of infants.(209) The questionnaire is divided into five categories, to evaluate five areas of the infant’s development: communication, gross motor skills, fine motor skills, problem solving, and personal-social skills. A score is obtained in each category and compared to pre-established cut-off values: if the result is 2 standard deviations below the average, the ASQ category is considered to be failed. Infants were evaluated for success or failure of the five

ASQ development categories. Infants were stratified according to the number of abnormal/failed categories: none, 1 to 3, 4, or 5.

Mann-Whitney U test was used to assess the association between amniotic fluid IL-6 and MMP-8 concentrations and the risk of at least one failed ASQ category, the number of failed ASQ categories, and failure of each specific category. Receiver-operating characteristics (ROC) curves were used to determine optimal cut-off values of amniotic fluid IL-6 and MMP-8 and their predictive values for 4 or 5 failed ASQ categories and abnormal gross motor skills. Univariate and multivariate logistic regressions were then performed to determine relative risks (RR) and their 95% confidence intervals (95%CI) for 4 or 5 failed categories and for abnormal gross motor skills using the determined cut-off values. Adjustments were made for prematurity, birthweight and infant's precise age at completion of ASQ (corrected for infants born <37 weeks of gestation). Multivariate logistic regression analyses were repeated for the subgroup of infants born at term. Statistical analyses were conducted with the SPSS software package (IBM SPSS Statistics, Version 23.0; Armonk, NY). P-value less than 0.05 was considered significant.

### **3.5 Results**

During the study period, 1406 participants from the initial cohort were eligible for the completion of the ASQ at 18 months. Of those, 745 (53%) participants accepted the ancillary project and returned the completed ASQ questionnaire. Thirty-six (4.8%) questionnaires were excluded because of gestational age outside the eligible range (n=29) or incomplete data (n=7). The remaining 709 participants were included in the analysis.

Among the 709 infants, 195 (27.5%) failed at least one ASQ category. Table 1 displays the proportion of infants who failed zero to five ASQ categories, as well as each ASQ development category.

Maternal and infants' characteristics of the group of infants with and without at least one failed ASQ category were compared using chi-square or fisher tests for categorical variables, and student t-test for continuous variables (table 2). The group of infants who failed at least one ASQ category had a lower corrected age at completion of ASQ. For all other variables (maternal age, gestational age at amniocentesis and at delivery, preterm birth, birthweight, low birthweight, and sex), both groups were similar.

The median midtrimester amniotic IL-6 concentration was similar in cases with (1.01 logMoM; IQR: 0.89 – 1.11) or without (1.00 logMoM; IQR: 0.89 – 1.12) at least one abnormal ASQ category ( $p=0.78$ ). The median midtrimester amniotic MMP-8 concentration was also similar in cases with (1.01 logMoM; IQR: 0.93 – 1.11) or without (1.00 logMoM; IQR: 0.91 – 1.09) at least one abnormal ASQ category ( $p=0.38$ ). Looking at the specific ASQ categories, we observed that infants with abnormal gross motor skills had greater midtrimester amniotic concentrations of IL-6 and MMP-8. Abnormal gross motor skills was associated with a higher level of MMP-8 (1.04 logMoM; IQR 0.94 – 1.15 vs 1.0 logMoM; IQR 0.92 – 1.09;  $p<0.05$ ) and a trend towards a higher level of IL-6 (1.08 logMoM; IQR: 0.93 – 1.16 vs 0.99 logMoM; IQR: 0.89 – 1.11;  $p=0.05$ ). Using ROC curves analyses, we calculated that an MMP-8 >1.09 logMoM (RR: 2.33; 95%CI: 1.24 – 4.36) and an IL-6 >1.10 logMoM (RR: 2.66; 95%CI: 1.43 – 4.95) were significantly associated with an increased risk of abnormal gross motor skills at ASQ.

After adjustment for potential confounding variables, including birthweight, gestational age at delivery, and infants' corrected age at completion of ASQ, we observed that MMP-8 >1.09 logMoM (RR: 2.08; 95%CI: 1.08 – 3.98) and IL-6 >1.10 logMoM (RR: 2.42; 95%CI: 1.27 – 4.60) remained associated with a significant greater risk of abnormal gross motor skills at ASQ. We repeated the analyses after excluding all infants born preterm and we observed similar results, with an IL-6 >1.10 logMoM being associated with a greater risk of abnormal gross motor skills at ASQ (adjusted RR: 2.08; 95%CI: 1.06 – 4.12).

Regarding the number of failed ASQ categories we calculated that a logMoM IL-6 >1.125 was associated with a trend towards a greater risk of 4 or 5 abnormal ASQ categories (RR: 4.44; 95%CI: 0.99 – 20.06;  $p=0.05$ ), which became significant after adjustments for potential confounding factors, including birthweight, gestational age at delivery and infants' corrected age at completion of ASQ (RR: 4.57; 95%CI: 1.01– 20.79,  $p=0.04$ ). Looking at the only two infants who failed all five ASQ categories, both were delivered at term. For one of them, the logMoM IL-6 concentration was greater than the 99<sup>th</sup> centile ( $p<0.05$ ) and its logMoM MMP-8 was greater than the 98<sup>th</sup> centile ( $p=0.06$ ).

### **3.6 Discussion**

We observed that failure of gross motor skills evaluation at 18<sup>th</sup> months using the ASQ was associated with greater concentration of IL-6 in the midtrimester. We also observed that severe

neurodevelopment disorders (defined as failure of at least 4 of the 5 ASQ categories) was also associated with midtrimester IAI. Importantly, similar results were obtained after exclusion of all infants born before term; thus, these observations could not be attributed to preterm birth. Our observations suggest that midtrimester amniotic inflammation can be asymptomatic, followed by term delivery, and lead to adverse neurodevelopment outcomes in infants.

Our results are in agreement with studies that evaluated the association between IAI and infants outcomes in symptomatic women: early exposure to IAI (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and MMP-8) and MIAC is associated with adverse infants' neurologic outcome, including cerebral palsy, suggesting that IAI contributes to cerebral lesions.(53-55) Additionally, clinical or histologic chorioamnionitis at the time of preterm delivery is a well-established risk factor for cerebral palsy.(167, 170) Our observations extend this association to asymptomatic women with IAI in early pregnancy.

Although we did not find other studies that have evaluated the neurologic outcome of infants exposed to IAI early in pregnancy, some have reported an increased risk of abnormal neurodevelopment in term and preterm infants whose mother had an extra-amniotic infection during pregnancy.(179-181, 183) Streja et al., in a prospective cohort study, found that maternal vaginal infection and fever during pregnancy increased the risk of cerebral palsy.(181) Similarly, Leviton reported that cervical or vaginal infections increased the risk of impaired motor development in infants born <28 weeks.(179) Neonatal infection and inflammation are also associated with adverse neurodevelopmental outcomes, which supports the hypothesis that early exposure to infection or inflammation increases the risk of adverse neurologic outcomes.(154, 157, 159, 161-164) In very preterm infants (<32 weeks), a neonatal infection has been associated with an increased risk of motor impairment, cognitive delay, and attention deficit hyperactivity disorder at the age of nine years old.(161) Moreover, in extremely preterm infants (<28 weeks), elevation of blood inflammatory proteins in the first two weeks of life was associated with impaired motor and mental development and cerebral palsy, while elevated C reactive protein was associated with cognitive, motor, and language development delay in very low birthweight preterm infants (<1500 g, <32 weeks).(163, 164, 210) We observed an association between elevated IL-6 and abnormal motor development in infants born at term; few studies have evaluated the neurologic outcome of children who were born at term.(166, 182, 183, 211) Consistent with our results, Miller et al. found that maternal genitourinary tract infections during pregnancy were associated with cerebral palsy in term infants.(183) Peripartum



infections were also associated with cerebral palsy in near term and term infants.(166, 182, 211) Hence, our results build upon previous evidence suggesting that infectious and inflammatory processes during pregnancy can affect foetuses who will subsequently be delivered at term. The exact mechanism by which fetal or neonatal inflammation and infection lead to adverse neurologic outcome has not been determined yet, although many authors have suggested that white matter damage was part of the causal pathway.(55, 161, 176, 212-214) Other mechanisms have also been proposed, including cerebral hypoperfusion, damage to the oligodendrocytes threatening myelination, and production of oxygen radicals.(215)

The current study has some limitation. First, we acknowledge the small number of participants considering the low incidence of severe neurodevelopment disorders in infants. Second, only 50% of eligible participants completed the 18 months follow-up with potential selection bias. However, it has also several major strengths including its prospective design, the facts that amniotic evaluation and infants' outcomes evaluation were performed by independent observers, and the associations remaining significant after exclusion of preterm births and after adjustment for potential confounders.

### **3.7 Conclusion**

We conclude that subclinical midtrimester IAI is not only associated with a risk of adverse obstetrical outcomes such as PTB, but also with a risk of abnormal neurologic infants' development, more specifically with abnormal gross motor skills development and severe neurodevelopment disorder, independently of gestational age at delivery.

**Table 3.1: Characteristics of the participants\***

	<b>Successful ASQ (no failed category) (N=514)</b>	<b>At least one failed ASQ development category (N=195)</b>	<b>p- value</b>
Maternal age	34.78 (21 - 45)	35.58 (19 - 44)	0.054
GA at amniocentesis	17.28 (14 - 24)	17.22 (15 - 23)	0.724
GA at delivery	39.45 (33 - 42)	39.48 (29 - 40)	0.798
Preterm birth	23 (4.5%)	10 (5.1%)	0.712
Birthweight	3415.84 (1600 - 5358)	3425.19 (870 - 4900)	0.824
Low birthweight	20 (3.9%)	9 (4.6%)	0.673
Sex			0.097
Girl	262 (51.0%)	86 (44.1%)	
Boy	251 (48.9%)	109 (55.9%)	
Missing data	1 (0.1%)	0 (0%)	
Age at completion of ASQ	18.43 (18 - 20)	18.31 (18 - 20)	<b>0.028</b>

\*Data reported as mean (range) or number (%)

**Table 3.2: Distribution of the ASQ results**

Distribution of infants	N (%)
<b>Infants with at least one failed ASQ category</b>	195 (27.5 %)
<b>Number of failed ASQ categories</b>	
0	514 (72.5 %)
1	137 (19.3 %)
2	41 (5.8 %)
3	10 (1.4 %)
4	5 (0.7 %)
5	2 (0.3 %)
<b>Failed ASQ category</b>	
Communication	59 (8.3 %)
Gross motor skills	43 (6.1%)
Fine motor skills	22 (3.1 %)
Problem solving	51 (7.2%)
Personal-social skills	107 (15.1%)



## Markers of inflammation & number of failed ASQ categories

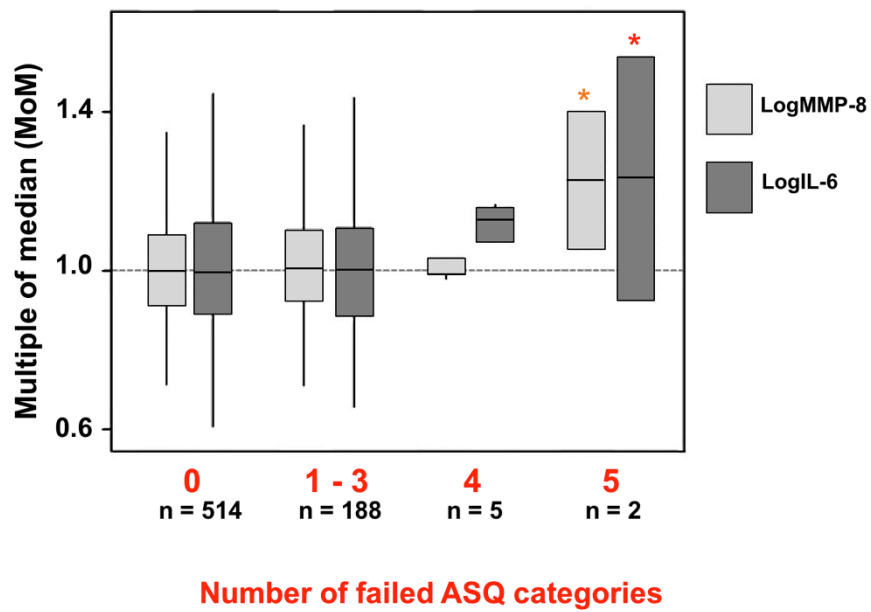


Figure 3.1. Markers of inflammation and number of failed ASQ categories

## 4. Discussion et conclusion

Le premier projet a permis d'observer une association entre la maladie parodontale diagnostiquée au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse et le développement de la prééclampsie. La maladie parodontale était associée à un risque près de six fois plus élevé de prééclampsie, et ce, indépendamment de l'indice de masse corporelle et du statut tabagique. La maladie parodontale n'était pas associée à la prématurité spontanée ni à l'inflammation amniotique. Notre étude était par contre limitée en termes de puissance statistique.

Le deuxième volet de ce projet a permis d'établir une association entre l'inflammation amniotique asymptomatique au deuxième trimestre de la grossesse et le devenir neurologique de l'enfant. L'inflammation amniotique subclinique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse était associée à un risque deux fois plus élevé de retard du développement de la motricité grossière chez l'enfant à l'âge de 18 mois. De plus, une inflammation plus sévère était associée à un retard du neuro-développement plus important. Ces associations étaient indépendantes de l'âge gestationnel à l'accouchement; ainsi, la prématurité ne peut pas être considérée comme facteur confondant et être utilisée pour expliquer cette association.

Notre étude supporte l'association entre la maladie parodontale et la prééclampsie rapportée par d'autres auteurs.(38-43) Trois méta-analyses ont démontré que le risque de prééclampsie chez les femmes enceintes ayant une maladie parodontale était de 2.2 à 3.7 fois plus élevé que chez les femmes n'ayant pas de maladie parodontale.(42, 192, 216) Également, dans un sous-groupe incluant quatre études de cohorte dans lesquelles la santé parodontale était évaluée avant la 32<sup>e</sup> semaine de grossesse, la maladie parodontale était associée à un risque 3.7 fois plus élevé de prééclampsie.(192) Nous n'avons pas observé d'association entre la maladie parodontale et la prématurité (spontanée et/ou induite). En accord avec nos résultats, Moore et al. ont effectué une étude de cohorte prospective incluant 3738 participantes dont l'évaluation parodontale était effectuée vers la 12<sup>e</sup> semaine d'âge gestationnel : la maladie parodontale n'était pas associée à un risque plus élevé de prématurité.(217) Également, Srinivas et al. n'ont pas observé d'association entre la maladie parodontale diagnostiquée avant 20 semaines de grossesse et la prématurité.(218) Quatre méta-analyses ont cependant observé que la maladie parodontale était associée à un risque de 1.6 à 2.7 fois plus élevé de prématurité; toutefois, une importante hétérogénéité était notée dans les

études.(187, 195, 219, 220) Enfin, nous n'avons pas observé d'association entre la maladie parodontale et l'inflammation intra-amniotique. De façon similaire, Kacerovsky et al. n'ont pas observé de corrélation entre les niveaux d'inflammation parodontale et intra-amniotique.(27) Nous ne pouvons toutefois pas éliminer la possibilité d'une erreur statistique de type 2 : de façon brute, les niveaux d'IL-6 et de MMP-8 amniotique étaient respectivement 330% et 250% plus élevés en présence de maladie parodontale (non significatif :  $p=0.23$  et  $p=0.10$  respectivement)

Plusieurs études qui s'étaient intéressées à l'association entre la maladie parodontale et les issues adverses de grossesse étaient limitées par un devis rétrospectif, une absence d'ajustement pour les facteurs confondants et une évaluation de la maladie parodontale tard en grossesse ou après l'accouchement.(44-50) Durant la grossesse, on observe une progression au niveau de la gencive qui peut favoriser un diagnostic de maladie parodontale, qui serait causée par des changements hormonaux, une augmentation de la perméabilité vasculaire, et des changements du système immunitaire. (84, 188) Il est possible que les critères diagnostiques utilisés pour la « maladie » parodontale soient un peu moins applicables à la grossesse ou mènent à un taux de faux-positifs plus important. Notre étude se distingue par son devis prospectif et par l'évaluation de la maladie parodontale tôt en grossesse, ce qui permet d'obtenir un meilleur reflet de la santé parodontale des femmes enceintes de notre population.

Le deuxième volet de ce projet a permis de mettre en évidence une association entre l'inflammation intra-amniotique subclinique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse et un retard du développement neurologique, particulièrement de la motricité grossière. Trois précédentes études ont démontré une association entre l'inflammation du liquide amniotique au moment de l'accouchement et la paralysie cérébrale : l'élévation de l'IL-1 beta, de l'IL-6, de l'IL-8, de l'IL-18, du TNF-alpha, et de la MMP-8 était associée à une augmentation du risque de paralysie cérébrale.(53-55). Par contre, ces études étaient limitées par le fait que le prélèvement était réalisé tardivement en grossesse chez des patientes en travail prématuré, alors que nous avons évalué la relation chez des femmes asymptomatiques au 2<sup>e</sup> trimestre. Nous n'avons pas trouvé d'autres études portant sur l'inflammation intra-amniotique au 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse et le développement neurologique de l'enfant. Cependant, une infection maternelle en grossesse pourrait avoir des impacts neurologiques néfastes tant chez les enfants nés à terme que chez ceux nés prématurément.(179-183)



La contribution de cette étude pour la communauté scientifique est significative. En effet, les études portant sur l'inflammation du liquide amniotique et son association aux issues neurologiques, sont basées sur des participantes dont l'amniocentèse était faite au moment d'un accouchement prématuré.(53-55) Notre étude se démarque par l'évaluation tôt en grossesse de l'inflammation intra-amniotique, permettant ainsi d'apporter des données nouvelles sur un sujet peu étudié.

Nos deux études présentaient certaines limites. Dans les 2 cas, la taille de l'échantillon était limitée en regard de la faible prévalence des complications de grossesse étudiées. En ce qui concerne notre première étude, nous avons utilisé une définition de maladie parodontale considérée modérée à sévère selon Offenbacher, alors qu'une proportion importante des participantes (45%) en ont eu le diagnostic.(191)

En ce qui concerne la deuxième étude, nous croyons que l'association est réelle pour plusieurs raisons malgré la faible puissance due à la rareté des atteintes neurologiques sévères : l'effet dose-réponse, la plausibilité biologique, et la chronologie observée entre l'inflammation et l'atteinte sont des arguments en faveur d'une réelle association. Une limite importante demeure toutefois le haut taux de participants perdus au suivi : nous croyons que ces pertes peuvent avoir engendré un biais de sélection favorable ou défavorable à l'association observée. Enfin, le choix de l'ASQ est discutable, puisqu'il s'agit habituellement d'un test de dépistage qui doit être validé par des tests réalisés par un ou des professionnels de santé. Par contre, il demeure un test fiable et largement utilisé dans le monde pour le dépistage des atteintes sévères.

En conclusion, le premier projet n'est pas en faveur d'une relation réelle entre la maladie parodontale, l'inflammation amniotique et la grande prématurité; par contre, le deuxième projet démontre une association claire entre l'inflammation amniotique et le devenir du fœtus, tant par l'augmentation de la grande prématurité que par le risque de développement d'une atteinte neurologique. Dans ce contexte, j'estime que des efforts devraient être concentrés sur les causes et les facteurs de risque de l'inflammation intra-amniotique pour qu'on soit en mesure d'intervenir en amont de la grande prématurité plutôt que sur le traitement de ses manifestations et de ses conséquences.





## Bibliographie

1. Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2010;116(2 Pt 1):393-401.
2. Musilova I, Andrys C, Drahosova M, Hornychova H, Jacobsson B, Menon R, et al. Amniotic fluid prostaglandin E2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of the membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(18):2915-23.
3. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(5):1130-6.
4. Romero R, Chaiworapongsa T, Alpay Savasan Z, Xu Y, Hussein Y, Dong Z, et al. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: a study of the alarmin HMGB1. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(12):1444-55.
5. Romero R, Miranda J, Chaemsaitong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(12):1394-409.
6. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Gotsch F, Dong Z, et al. Sterile intra-amniotic inflammation in asymptomatic patients with a sonographic short cervix: prevalence and clinical significance. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014:1-17.
7. Park JY, Romero R, Lee J, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH. An elevated amniotic fluid prostaglandin F2alpha concentration is associated with intra-amniotic inflammation/infection, and clinical and histologic chorioamnionitis, as well as impending preterm delivery in patients with preterm labor and intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(16):2563-72.
8. Park CW, Yoon BH, Kim SM, Park JS, Jun JK. The frequency and clinical significance of intra-amniotic inflammation defined as an elevated amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 in patients with preterm labor and low amniotic fluid white blood cell counts. *Obstet Gynecol Sci.* 2013;56(3):167-75.
9. Combs CA, Gravett M, Garite TJ, Hickok DE, Lapidus J, Porreco R, et al. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;210(2):125 e1- e15.
10. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsaitong P, Gotsch F, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(5):458-74.
11. Gervasi MT, Romero R, Bracalente G, Erez O, Dong Z, Hassan SS, et al. Midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10: evidence for heterogeneity of intra-amniotic inflammation and associations with spontaneous early (<32 weeks) and late (>32 weeks) preterm delivery. *J Perinat Med.* 2012;40(4):329-43.
12. Biggio JR, Jr., Ramsey PS, Cliver SP, Lyon MD, Goldenberg RL, Wenstrom KD. Midtrimester amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) levels above the 90th percentile are a marker for subsequent preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(1):109-13.

13. Kim SM, Romero R, Lee J, Chaemsaitong P, Lee MW, Chaiyasit N, et al. About one-half of early spontaneous preterm deliveries can be identified by a rapid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) bedside test at the time of mid-trimester genetic amniocentesis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(15):2414-22.
14. Thomakos N, Daskalakis G, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Amniotic fluid interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha at mid-trimester genetic amniocentesis: relationship to intra-amniotic microbial invasion and preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;148(2):147-51.
15. Daskalakis G, Thomakos N, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Amniotic fluid interleukin-18 at mid-trimester genetic amniocentesis: relationship to intraamniotic microbial invasion and preterm delivery. *BJOG.* 2009;116(13):1743-8.
16. Yoon BH, Oh SY, Romero R, Shim SS, Han SY, Park JS, et al. An elevated amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 level at the time of mid-trimester genetic amniocentesis is a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(5):1162-7.
17. Lee SM, Park JS, Norwitz ER, Oh S, Kim EJ, Kim SM, et al. Mid-trimester amniotic fluid pro-inflammatory biomarkers predict the risk of spontaneous preterm delivery in twins: a retrospective cohort study. *J Perinatol.* 2015;35(8):542-6.
18. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutrition reviews.* 2007;65(12 Pt 2):S194-202.
19. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):826-37.
20. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000;342(20):1500-7.
21. Gauthier S, Tetu A, Himaya E, Morand M, Chandad F, Rallu F, et al. The origin of *Fusobacterium nucleatum* involved in intra-amniotic infection and preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(11):1329-32.
22. Morency AM, Rallu F, Laferriere C, Bujold E. Eradication of intra-amniotic *Streptococcus mutans* in a woman with a short cervix. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006;28(10):898-902.
23. Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B, et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):553-9.
24. Smith B, Kemp M, Ethelberg S, Schiellerup P, Bruun BG, Gerner-Smidt P, et al. *Listeria monocytogenes*: maternal-foetal infections in Denmark 1994-2005. *Scand J Infect Dis.* 2009;41(1):21-5.
25. Shute KM, Kimber RG. *Haemophilus influenzae* intra-amniotic infection with intact membranes. *J Am Board Fam Pract.* 1994;7(4):335-41.
26. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *Journal of clinical periodontology.* 2013;40 Suppl 14:S170-80.
27. Kacerovsky M, Radochova V, Musilova I, Stepan M, Slezak R, Andrys C, et al. Levels of multiple proteins in gingival crevicular fluid and intra-amniotic complications in women with preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017:1.

28. Papapanou PN. Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. *Int Dent J*. 2015.
29. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
30. Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, MacKenzie D, Shearer B. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*. 2005;32(7):708-13.
31. Crasta K, Daly CG, Mitchell D, Curtis B, Stewart D, Heitz-Mayfield LJ. Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol*. 2009;36(4):323-32.
32. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008;35(4):277-90.
33. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005;76(11 Suppl):2106-15.
34. Bulut G, Olukman O, Calkavur S. Is there a relationship between maternal periodontitis and pre-term birth? A prospective hospital-based case-control study. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(8):866-73.
35. Perunovic N, Rakic MM, Nikolic LI, Jankovic SM, Aleksic ZM, Plecas DV, et al. The Association Between Periodontal Inflammation and Labor Triggers (Elevated Cytokine Levels) in Preterm Birth: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol*. 2016;87(3):248-56.
36. Jacob PS, Nath S. Periodontitis among poor rural Indian mothers increases the risk of low birth weight babies: a hospital-based case control study. *J Periodontal Implant Sci*. 2014;44(2):85-93.
37. Meqa K, Dragidella F, Disha M, Sllamniku-Dalipi Z. The Association between Periodontal Disease and Preterm Low Birthweight in Kosovo. *Acta Stomatol Croat*. 2017;51(1):33-40.
38. Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *J Periodontol*. 2013;84(4 Suppl):S181-94.
39. Varshney S, Gautam A. Poor periodontal health as a risk factor for development of pre-eclampsia in pregnant women. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18(3):321-5.
40. Ha JE, Jun JK, Ko HJ, Paik DI, Bae KH. Association between periodontitis and preeclampsia in never-smokers: a prospective study. *J Clin Periodontol*. 2014;41(9):869-74.
41. Pattanashetti JI, Nagathan VM, Rao SM. Evaluation of Periodontitis as a Risk for Preterm Birth among Preeclamptic and Non-Preeclamptic Pregnant Women - A Case Control Study. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(8):1776-8.
42. Wei BJ, Chen YJ, Yu L, Wu B. Periodontal disease and risk of preeclampsia: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2013;8(8):e70901.
43. Alchalabi HA, Al Habashneh R, Jabali OA, Khader YS. Association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes in a cohort of pregnant women in Jordan. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2013;40(3):399-402.
44. Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *BJOG*. 2006;113(2):135-43.

45. Goepfert AR, Jeffcoat MK, Andrews WW, Faye-Petersen O, Cliver SP, Goldenberg RL, et al. Periodontal disease and upper genital tract inflammation in early spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2004;104(4):777-83.
46. Radnai M, Gorzo I, Nagy E, Urban E, Novak T, Pal A. A possible association between preterm birth and early periodontitis. A pilot study. *J Clin Periodontol.* 2004;31(9):736-41.
47. Jarjoura K, Devine PC, Perez-Delboy A, Herrera-Abreu M, D'Alton M, Papapanou PN. Markers of periodontal infection and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(2):513-9.
48. Nabet C, Lelong N, Colombier ML, Sixou M, Musset AM, Goffinet F, et al. Maternal periodontitis and the causes of preterm birth: the case-control Epipap study. *J Clin Periodontol.* 2010;37(1):37-45.
49. Taghzouti N, Xiong X, Gornitsky M, Chandad F, Voyer R, Gagnon G, et al. Periodontal disease is not associated with preeclampsia in Canadian pregnant women. *J Periodontol.* 2012;83(7):871-7.
50. Vettore MV, Lamarca Gde A, Leao AT, Thomaz FB, Sheiham A, Leal Mdo C. Periodontal infection and adverse pregnancy outcomes: a systematic review of epidemiological studies. *Cad Saude Publica.* 2006;22(10):2041-53.
51. Kacerovsky M, Radochova V, Musilova I, Stepan M, Slezak R, Andrys C, et al. Levels of multiple proteins in gingival crevicular fluid and intra-amniotic complications in women with preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017:1-9.
52. Radochova V, Kacerovska Musilova I, Stepan M, Vescicik P, Slezak R, Jacobsson B, et al. Periodontal disease and intra-amniotic complications in women with preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017:1-10.
53. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH, et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(3):675-81.
54. Moon JB, Kim JC, Yoon BH, Romero R, Kim G, Oh SY, et al. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 and the development of cerebral palsy. *Journal of perinatal medicine.* 2002;30(4):301-6.
55. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177(1):19-26.
56. Cunningham FG. *Williams obstetrics.* 24th edition. ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2014. xviii, 1358 pages p.
57. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev.* 2010;20(4):327-48.
58. Lenroot RK, Giedd JN. Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(6):718-29.
59. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research.* 2004;114(5-6):397-407.
60. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol.* 2005;25(5):341-8.

61. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. Aust Dent J. 2009;54 Suppl 1:S11-26.
62. Patton LL, McKaig R. Rapid progression of bone loss in HIV-associated necrotizing ulcerative stomatitis. J Periodontol. 1998;69(6):710-6.
63. Ramos MP, Ferreira SM, Silva-Boghossian CM, Souto R, Colombo AP, Noce CW, et al. Necrotizing periodontal diseases in HIV-infected Brazilian patients: a clinical and microbiologic descriptive study. Quintessence Int. 2012;43(1):71-82.
64. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. Dent Clin North Am. 2005;49(3):491-516, v.
65. Armitage GC. The complete periodontal examination. Periodontol 2000. 2004;34:22-33.
66. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. J Clin Periodontol. 2009;36(6):458-67.
67. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32 Suppl 6:132-58.
68. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. Periodontol 2000. 2002;29:7-10.
69. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. J Dent Res. 2014;93(11):1045-53.
70. Zuk A, Quinonez C, Lebenbaum M, Rosella LC. The association between undiagnosed glycaemic abnormalities and cardiometabolic risk factors with periodontitis: results from 2007-2009 Canadian Health Measures Survey. J Clin Periodontol. 2017;44(2):132-41.
71. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000. 1997;14:112-43.
72. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. J Periodontol. 1996;67(10 Suppl):1103-13.
73. Blanc V, O'Valle F, Pozo E, Puertas A, Leon R, Mesa F. Oral bacteria in placental tissues: increased molecular detection in pregnant periodontitis patients. Oral Dis. 2015;21(7):905-12.
74. Leon R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M, et al. Detection of Porphyromonas gingivalis in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. J Periodontol. 2007;78(7):1249-55.
75. Han YW, Fardini Y, Chen C, Iacampo KG, Peraino VA, Shamonki JM, et al. Term stillbirth caused by oral Fusobacterium nucleatum. Obstet Gynecol. 2010;115(2 Pt 2):442-5.
76. Carta G, Persia G, Falciglia K, Iovenitti P. Periodontal disease and poor obstetrical outcome. Clin Exp Obstet Gynecol. 2004;31(1):47-9.
77. Dortbudak O, Eberhardt R, Ulm M, Persson GR. Periodontitis, a marker of risk in pregnancy for preterm birth. J Clin Periodontol. 2005;32(1):45-52.

78. Fiorini T, Vianna P, Weidlich P, Musskopf ML, Moreira CH, Chies JA, et al. Relationship between cytokine levels in serum and gingival crevicular fluid (GCF) in pregnant women. *Cytokine*. 2012;58(1):34-9.
79. Schwendicke F, Karimbux N, Allareddy V, Gluud C. Periodontal treatment for preventing adverse pregnancy outcomes: a meta- and trial sequential analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129060.
80. Penova-Veselinovic B, Keelan JA, Wang CA, Newnham JP, Pennell CE. Changes in inflammatory mediators in gingival crevicular fluid following periodontal disease treatment in pregnancy: relationship to adverse pregnancy outcome. *J Reprod Immunol*. 2015;112:1-10.
81. Lopez NJ, Uribe S, Martinez B. Effect of periodontal treatment on preterm birth rate: a systematic review of meta-analyses. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):87-130.
82. Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P, Committee SHG. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J Obstet Gynaecol Can*. 2014;36(7):575-6.
83. Chavarria ME, Lara-Gonzalez L, Garcia-Paleta Y, Vital-Reyes VS, Reyes A. Adhesion molecules changes at 20 gestation weeks in pregnancies complicated by preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;137(2):157-64.
84. Zi MY, Longo PL, Bueno-Silva B, Mayer MP. Mechanisms Involved in the Association between Periodontitis and Complications in Pregnancy. *Front Public Health*. 2014;2:290.
85. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
86. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med*. 2007;25(1):21-39.
87. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol*. 2008;79(1):50-7.
88. Lee SE, Romero R, Jung H, Park CW, Park JS, Yoon BH. The intensity of the fetal inflammatory response in intraamniotic inflammation with and without microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(3):294 e1-6.
89. Kim SM, Romero R, Lee J, Chaemsathong P, Lee MW, Chaiyasit N, et al. About one-half of early spontaneous preterm deliveries can be identified by a rapid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) bedside test at the time of mid-trimester genetic amniocentesis. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2015:1-9.
90. Kim CJ, Romero R, Chaemsathong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4 Suppl):S29-52.
91. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2007;110(3):687-94.
92. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(1):16-26.

93. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
94. Mendz GL, Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:58.
95. 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 Suppl 2:41-56.
96. Fray RE, Davis TP, Brown EA. Clostridium welchii infection after amniocentesis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;288(6421):901-2.
97. Hamoda H, Chamberlain PF. Clostridium welchii infection following amniocentesis: a case report and review of the literature. *Prenat Diagn*. 2002;22(9):783-5.
98. Kim KH, Jeong MH, Chung IJ, Cho JG, Song TB, Park JC, et al. A case of septic shock and disseminated intravascular coagulation complicated by acute myocardial infarction following amniocentesis. *Korean J Intern Med*. 2005;20(4):325-9.
99. Hamanishi J, Itoh H, Sagawa N, Nakayama T, Yamada S, Nakamura K, et al. A case of successful management of maternal septic shock with multiple organ failure following amniocentesis at midgestation. *J Obstet Gynaecol Res*. 2002;28(5):258-61.
100. Papapanou PN. Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. *Int Dent J*. 2015;65(6):283-91.
101. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Gotsch F, Dong Z, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(4):330-58.
102. Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. Clinical implications of detection of Ureaplasma urealyticum in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(5):1130-7.
103. Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013;208(3):226 e1-7.
104. Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric research*. 2005;57(3):404-11.
105. Miles SM, Hardy BL, Merrell DS. Investigation of the microbiota of the reproductive tract in women undergoing a total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. *Fertil Steril*. 2017;107(3):813-20 e1.
106. Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kusanovic JP, Erez O, Soto E, et al. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(4):1025-30.
107. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*. 2012;379(9832):2162-72.

108. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*. 2010;88(1):31-8.
109. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*. 2008;371(9608):261-9.
110. Davis NM, Ford GW, Anderson PJ, Doyle LW, Victorian Infant Collaborative Study G. Developmental coordination disorder at 8 years of age in a regional cohort of extremely-low-birthweight or very preterm infants. *Dev Med Child Neurol*. 2007;49(5):325-30.
111. Johnson S, Evans TA, Draper ES, Field DJ, Manktelow BN, Marlow N, et al. Neurodevelopmental outcomes following late and moderate prematurity: a population-based cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(4):F301-8.
112. Doyle LW, Roberts G, Anderson PJ, Victorian Infant Collaborative Study G. Outcomes at age 2 years of infants < 28 weeks' gestational age born in Victoria in 2005. *J Pediatr*. 2010;156(1):49-53 e1.
113. Hirvonen M, Ojala R, Korhonen P, Haataja P, Eriksson K, Rantanen K, et al. Intellectual disability in children aged less than seven years born moderately and late preterm compared with very preterm and term-born children - a nationwide birth cohort study. *J Intellect Disabil Res*. 2017.
114. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, et al. The fetal inflammatory response syndrome. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007;50(3):652-83.
115. Musilova I, Andrys C, Drahosova M, Soucek O, Stepan M, Bestvina T, et al. Intraamniotic inflammation and umbilical cord blood interleukin-6 concentrations in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017;30(8):900-10.
116. Pacora P, Chaiworapongsa T, Maymon E, Kim YM, Gomez R, Yoon BH, et al. Funisitis and chorionic vasculitis: the histological counterpart of the fetal inflammatory response syndrome. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2002;11(1):18-25.
117. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(1):194-202.
118. Hofer N, Kothari R, Morris N, Muller W, Resch B. The fetal inflammatory response syndrome is a risk factor for morbidity in preterm neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(6):542 e1- e11.
119. Ozalkaya E, Karatekin G, Topcuoglu S, Gursoy T, Ovali F. Morbidity in preterm infants with fetal inflammatory response syndrome. *Pediatr Int*. 2016;58(9):850-4.
120. Armstrong-Wells J, Donnelly M, Post MD, Manco-Johnson MJ, Winn VD, Sebire G. Inflammatory predictors of neurologic disability after preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(2):212 e1-9.
121. Archabald KL, Buhimschi IA, Bahtiyar MO, Dulay AT, Abdel-Razeq SS, Pettker CM, et al. Limiting the Exposure of Select Fetuses to Intrauterine Infection/Inflammation Improves Short-Term Neonatal Outcomes in Preterm Premature Rupture of Membranes. *Fetal Diagn Ther*. 2016.



122. Lee J, Romero R, Kim SM, Chaemsaihong P, Park CW, Park JS, et al. A new anti-microbial combination prolongs the latency period, reduces acute histologic chorioamnionitis as well as funisitis, and improves neonatal outcomes in preterm PROM. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(5):707-20.
123. American Psychiatric Association., American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. 5th ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association; 2013. xlv, 947 p. p.
124. Cossette L. DE. A Profile of Disability in Canada, 2001. In: Canada S, editor. Canada2002.
125. Rutter M. Rutter's child and adolescent psychiatry. 5th ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub.; 2008. 1230 p. p.
126. Brugha TS, McManus S, Bankart J, Scott F, Purdon S, Smith J, et al. Epidemiology of autism spectrum disorders in adults in the community in England. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(5):459-65.
127. Baron-Cohen S, Scott FJ, Allison C, Williams J, Bolton P, Matthews FE, et al. Prevalence of autism-spectrum conditions: UK school-based population study. *Br J Psychiatry.* 2009;194(6):500-9.
128. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry.* 2007;164(6):942-8.
129. Altarac M, Saroha E. Lifetime prevalence of learning disability among US children. *Pediatrics.* 2007;119 Suppl 1:S77-83.
130. Lingam R, Hunt L, Golding J, Jongmans M, Emond A. Prevalence of developmental coordination disorder using the DSM-IV at 7 years of age: a UK population-based study. *Pediatrics.* 2009;123(4):e693-700.
131. Jimenez-Gomez A, Standridge SM. A refined approach to evaluating global developmental delay for the international medical community. *Pediatr Neurol.* 2014;51(2):198-206.
132. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res.* 2001;49(6):735-41.
133. Srour M, Mazer B, Shevell MI. Analysis of clinical features predicting etiologic yield in the assessment of global developmental delay. *Pediatrics.* 2006;118(1):139-45.
134. Majnemer A, Shevell MI. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. *J Pediatr.* 1995;127(2):193-9.
135. Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic yield of single domain developmental delay: a prospective study. *J Pediatr.* 2000;137(5):633-7.
136. Moeschler JB, Shevell M, American Academy of Pediatrics Committee on G. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics.* 2006;117(6):2304-16.
137. Bhutta ZA, Guerrant RL, Nelson CA, 3rd. Neurodevelopment, Nutrition, and Inflammation: The Evolving Global Child Health Landscape. *Pediatrics.* 2017;139(Suppl 1):S12-S22.
138. Bos AF, Roze E. Neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Dev Med Child Neurol.* 2011;53 Suppl 4:35-9.

139. Cheong JL, Doyle LW, Burnett AC, Lee KJ, Walsh JM, Potter CR, et al. Association Between Moderate and Late Preterm Birth and Neurodevelopment and Social-Emotional Development at Age 2 Years. *JAMA Pediatr.* 2017;171(4):e164805.
140. Shepherd EG, Knupp AM, Welty SE, Susey KM, Gardner WP, Gest AL. An interdisciplinary bronchopulmonary dysplasia program is associated with improved neurodevelopmental outcomes and fewer rehospitalizations. *J Perinatol.* 2012;32(1):33-8.
141. Anderson PJ, Doyle LW. Neurodevelopmental outcome of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 2006;30(4):227-32.
142. Snookes SH, Gunn JK, Eldridge BJ, Donath SM, Hunt RW, Galea MP, et al. A systematic review of motor and cognitive outcomes after early surgery for congenital heart disease. *Pediatrics.* 2010;125(4):e818-27.
143. Majnemer A, Limperopoulos C, Shevell M, Rosenblatt B, Rohlicek C, Tchervenkov C. Long-term neuromotor outcome at school entry of infants with congenital heart defects requiring open-heart surgery. *J Pediatr.* 2006;148(1):72-7.
144. Majnemer A, Limperopoulos C, Shevell M, Rohlicek C, Rosenblatt B, Tchervenkov C. Developmental and functional outcomes at school entry in children with congenital heart defects. *J Pediatr.* 2008;153(1):55-60.
145. Laing S, Walker K, Ungerer J, Badawi N, Spence K. Early development of children with major birth defects requiring newborn surgery. *J Paediatr Child Health.* 2011;47(3):140-7.
146. To T, Guttman A, Dick PT, Rosenfield JD, Parkin PC, Tassoudji M, et al. Risk markers for poor developmental attainment in young children: results from a longitudinal national survey. *Archives of pediatrics & adolescent medicine.* 2004;158(7):643-9.
147. Williams R, Clinton J, Canadian Paediatric Society EYTF. Getting it right at 18 months: In support of an enhanced well-baby visit. *Paediatr Child Health.* 2011;16(10):647-54.
148. Harris SR. A plea for developmental motor screening in Canadian infants. *Paediatr Child Health.* 2016;21(3):129-30.
149. Granild-Jensen JB, Rackauskaite G, Flachs EM, Uldall P. Predictors for early diagnosis of cerebral palsy from national registry data. *Dev Med Child Neurol.* 2015;57(10):931-5.
150. Arabameri E, Sotoodeh MS. Early developmental delay in children with autism: A study from a developing country. *Infant Behav Dev.* 2015;39:118-23.
151. Canadian Task Force on Preventive Health C, Tonelli M, Parkin P, Brauer P, Leduc D, Pottie K, et al. Recommendations on screening for developmental delay. *CMAJ.* 2016;188(8):579-87.
152. Warren R, Kenny M, Bennett T, Fitzpatrick-Lewis D, Ali MU, Sherifali D, et al. Screening for developmental delay among children aged 1-4 years: a systematic review. *CMAJ Open.* 2016;4(1):E20-7.
153. Walker K, Holland AJ, Halliday R, Badawi N. Which high-risk infants should we follow-up and how should we do it? *J Paediatr Child Health.* 2012;48(9):789-93.

154. Martin CR, Dammann O, Allred EN, Patel S, O'Shea TM, Kuban KC, et al. Neurodevelopment of extremely preterm infants who had necrotizing enterocolitis with or without late bacteremia. *J Pediatr*. 2010;157(5):751-6 e1.
155. Bassler D, Stoll BJ, Schmidt B, Asztalos EV, Roberts RS, Robertson CM, et al. Using a count of neonatal morbidities to predict poor outcome in extremely low birth weight infants: added role of neonatal infection. *Pediatrics*. 2009;123(1):313-8.
156. Salhab WA, Perlman JM, Silver L, Sue Broyles R. Necrotizing enterocolitis and neurodevelopmental outcome in extremely low birth weight infants <1000 g. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2004;24(9):534-40.
157. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*. 2004;292(19):2357-65.
158. Costantine MM, How HY, Coppage K, Maxwell RA, Sibai BM. Does peripartum infection increase the incidence of cerebral palsy in extremely low birthweight infants? *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(5):e6-8.
159. Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, Latzin P, et al. Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants. *Pediatrics*. 2011;128(2):e348-57.
160. Hentges CR, Silveira RC, Procianoy RS, Carvalho CG, Filipouski GR, Fuentefria RN, et al. Association of late-onset neonatal sepsis with late neurodevelopment in the first two years of life of preterm infants with very low birth weight. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90(1):50-7.
161. Rand KM, Austin NC, Inder TE, Bora S, Woodward LJ. Neonatal Infection and Later Neurodevelopmental Risk in the Very Preterm Infant. *J Pediatr*. 2016;170:97-104.
162. Mitha A, Foix-L'Helias L, Arnaud C, Marret S, Vieux R, Aujard Y, et al. Neonatal infection and 5-year neurodevelopmental outcome of very preterm infants. *Pediatrics*. 2013;132(2):e372-80.
163. Kuban KC, O'Shea TM, Allred EN, Paneth N, Hirtz D, Fichorova RN, et al. Systemic inflammation and cerebral palsy risk in extremely preterm infants. *Journal of child neurology*. 2014;29(12):1692-8.
164. Rose J, Vassar R, Cahill-Rowley K, Hintz SR, Stevenson DK. Neonatal Biomarkers of Inflammation: Correlates of Early Neurodevelopment and Gait in Very-Low-Birth-Weight Preterm Children. *American journal of perinatology*. 2015.
165. Blume HK, Li CI, Loch CM, Koepsell TD. Intrapartum fever and chorioamnionitis as risks for encephalopathy in term newborns: a case-control study. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50(1):19-24.
166. Wu YW, Escobar GJ, Grether JK, Croen LA, Greene JD, Newman TB. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. *JAMA*. 2003;290(20):2677-84.
167. Shatrov JG, Birch SC, Lam LT, Quinlivan JA, McIntyre S, Mendz GL. Chorioamnionitis and cerebral palsy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2010;116(2 Pt 1):387-92.
168. Shevell A, Wintermark P, Benini R, Shevell M, Oskoui M. Chorioamnionitis and cerebral palsy: lessons from a patient registry. *Eur J Paediatr Neurol*. 2014;18(3):301-7.

169. Pappas A, Kendrick DE, Shankaran S, Stoll BJ, Bell EF, Laptook AR, et al. Chorioamnionitis and early childhood outcomes among extremely low-gestational-age neonates. *JAMA Pediatr.* 2014;168(2):137-47.
170. Wu YW, Colford JM, Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA.* 2000;284(11):1417-24.
171. Tita AT, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):339-54.
172. O'Shea TM, Klinepeter KL, Meis PJ, Dillard RG. Intrauterine infection and the risk of cerebral palsy in very low-birthweight infants. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1998;12(1):72-83.
173. Berger A, Witt A, Haiden N, Kaider A, Klebermasz K, Fuiko R, et al. Intrauterine infection with *Ureaplasma* species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. *J Perinat Med.* 2009;37(1):72-8.
174. Neufeld MD, Frigon C, Graham AS, Mueller BA. Maternal infection and risk of cerebral palsy in term and preterm infants. *J Perinatol.* 2005;25(2):108-13.
175. Bear JJ, Wu YW. Maternal Infections During Pregnancy and Cerebral Palsy in the Child. *Pediatr Neurol.* 2016;57:74-9.
176. Lee I, Neil JJ, Huettner PC, Smyser CD, Rogers CE, Shimony JS, et al. The impact of prenatal and neonatal infection on neurodevelopmental outcomes in very preterm infants. *J Perinatol.* 2014;34(10):741-7.
177. Soraisham AS, Trevenen C, Wood S, Singhal N, Sauve R. Histological chorioamnionitis and neurodevelopmental outcome in preterm infants. *J Perinatol.* 2013;33(1):70-5.
178. Horvath B, Grasselly M, Turay A, Hegedus A, Oreg Z. [Histologic chorioamnionitis is associated with cerebral palsy]. *Orv Hetil.* 2006;147(5):211-6.
179. Leviton A, Allred EN, Kuban KC, O'Shea TM, Paneth N, Onderdonk AB, et al. The Development of Extremely Preterm Infants Born to Women Who Had Genitourinary Infections During Pregnancy. *Am J Epidemiol.* 2016;183(1):28-35.
180. O'Callaghan ME, MacLennan AH, Gibson CS, McMichael GL, Haan EA, Broadbent JL, et al. Epidemiologic associations with cerebral palsy. *Obstet Gynecol.* 2011;118(3):576-82.
181. Streja E, Miller JE, Bech BH, Greene N, Pedersen LH, Yeargin-Allsopp M, et al. Congenital cerebral palsy and prenatal exposure to self-reported maternal infections, fever, or smoking. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(4):332 e1- e10.
182. Ahlin K, Himmelmann K, Hagberg G, Kacerovsky M, Cobo T, Wennerholm UB, et al. Cerebral palsy and perinatal infection in children born at term. *Obstet Gynecol.* 2013;122(1):41-9.
183. Miller JE, Pedersen LH, Streja E, Bech BH, Yeargin-Allsopp M, Van Naarden Braun K, et al. Maternal infections during pregnancy and cerebral palsy: a population-based cohort study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2013;27(6):542-52.
184. Kinane DF, Lappin DF. Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol.* 2002;7(1):62-71.

185. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):1-36.
186. Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract*. 2012;12(3 Suppl):20-8.
187. Corbella S, Taschieri S, Francetti L, De Siena F, Del Fabbro M. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Odontology*. 2012;100(2):232-40.
188. Laine MA. Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand*. 2002;60(5):257-64.
189. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):233-50.
190. Cetin I, Pileri P, Villa A, Calabrese S, Ottolenghi L, Abati S. Pathogenic mechanisms linking periodontal diseases with adverse pregnancy outcomes. *Reprod Sci*. 2012;19(6):633-41.
191. Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol*. 2007;78(10):1911-25.
192. Huang X, Wang J, Liu J, Hua L, Zhang D, Hu T, et al. Maternal periodontal disease and risk of preeclampsia: a meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2014;34(5):729-35.
193. Vergnes JN, Sixou M. Preterm low birth weight and maternal periodontal status: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(2):135 e1-7.
194. Khader YS, Ta'ani Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J Periodontol*. 2005;76(2):161-5.
195. Chambrone L, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies. *J Clin Periodontol*. 2011;38(9):795-808.
196. Goldenberg RL, Culhane JF. Preterm birth and periodontal disease. *N Engl J Med*. 2006;355(18):1925-7.
197. Boutin A, Demers S, Roberge S, Roy-Morency A, Chandad F, Bujold E. Treatment of periodontal disease and prevention of preterm birth: systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol*. 2013;30(7):537-44.
198. Morency AM, Bujold E. The effect of second-trimester antibiotic therapy on the rate of preterm birth. *J Obstet Gynaecol Can*. 2007;29(1):35-44.
199. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract*. 2013;22 Suppl 1:8-19.
200. Rustveld LO, Kelsey SF, Sharma R. Association between maternal infections and preeclampsia: a systematic review of epidemiologic studies. *Matern Child Health J*. 2008;12(2):223-42.
201. Figuero E, Carrillo-de-Albornoz A, Martin C, Tobias A, Herrera D. Effect of pregnancy on gingival inflammation in systemically healthy women: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2013;40(5):457-73.

202. Xie Y, Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Pridjian G, Maney P, Delarosa RL, et al. Change of periodontal disease status during and after pregnancy. *J Periodontol.* 2013;84(6):725-31.
203. Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M, Group EPS. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *The New England journal of medicine.* 2005;352(1):9-19.
204. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, et al. High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177(2):406-11.
205. Kasper DC, Mechtler TP, Bohm J, Petricevic L, Gleiss A, Spargser J, et al. In utero exposure to *Ureaplasma* spp. is associated with increased rate of bronchopulmonary dysplasia and intraventricular hemorrhage in preterm infants. *J Perinat Med.* 2011;39(3):331-6.
206. Horvath B, Grasselly M, Bodecs T, Boncz I, Bodis J. Histological chorioamnionitis is associated with cerebral palsy in preterm neonates. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology.* 2012;163(2):160-4.
207. Wenstrom KD, Andrews WW, Tamura T, DuBard MB, Johnston KE, Hemstreet GP. Elevated amniotic fluid interleukin-6 levels at genetic amniocentesis predict subsequent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175(4 Pt 1):830-3.
208. Oz M, Polat B, Ozgu E, Seckin KD, Tasin C, Danisman N. Interleukin-6 and C-reactive protein levels in the amniotic fluid as indicators of preterm delivery in Turkish women. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology.* 2015;42(6):801-4.
209. Squires J, Bricker D, Potter L. Revision of a parent-completed development screening tool: Ages and Stages Questionnaires. *Journal of pediatric psychology.* 1997;22(3):313-28.
210. O'Shea TM, Allred EN, Kuban KC, Dammann O, Paneth N, Fichorova R, et al. Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at 2 years of age in extremely preterm infants. *The Journal of pediatrics.* 2012;160(3):395-401 e4.
211. Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA.* 1997;278(3):207-11.
212. Chau V, Brant R, Poskitt KJ, Tam EW, Synnes A, Miller SP. Postnatal infection is associated with widespread abnormalities of brain development in premature newborns. *Pediatric research.* 2012;71(3):274-9.
213. Glass HC, Bonifacio SL, Chau V, Glidden D, Poskitt K, Barkovich AJ, et al. Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. *Pediatrics.* 2008;122(2):299-305.
214. Shah DK, Doyle LW, Anderson PJ, Bear M, Daley AJ, Hunt RW, et al. Adverse neurodevelopment in preterm infants with postnatal sepsis or necrotizing enterocolitis is mediated by white matter abnormalities on magnetic resonance imaging at term. *The Journal of pediatrics.* 2008;153(2):170-5, 5 e1.
215. Huleihel M, Golan H, Hallak M. Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2004;2:17.
216. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Relationship between periodontitis and pre-eclampsia: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(8):e71387.

217. Moore S, Ide M, Coward PY, Randhawa M, Borkowska E, Baylis R, et al. A prospective study to investigate the relationship between periodontal disease and adverse pregnancy outcome. *Br Dent J*. 2004;197(5):251-8; discussion 47.
218. Srinivas SK, Sammel MD, Stamilio DM, Clothier B, Jeffcoat MK, Parry S, et al. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: is there an association? *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(5):497 e1-8.
219. Konopka T, Paradowska-Stolarz A. Periodontitis and risk of preterm birth and low birthweight--a meta-analysis. *Ginekol Pol*. 2012;83(6):446-53.
220. Corbella S, Taschieri S, Del Fabbro M, Francetti L, Weinstein R, Ferrazzi E. Adverse pregnancy outcomes and periodontitis: A systematic review and meta-analysis exploring potential association. *Quintessence Int*. 2016;47(3):193-204.