

Université de Cocody



UFR Sciences Médicales

Année Universitaire
2002-2003

D-BHT N° 1

THESE UNIQUE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur

en Biologie Humaine Tropicale

Option : Microbiologie

ETUDE DES INFECTIONS GENITALES A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN CÔTE D'IVOIRE : UTILISATION DE METHODES ALTERNATIVES ET POLYMORPHISME DES SOUCHES.

Présentée et soutenue publiquement le 24 Juillet 2003

Par :

BANKOLE Honoré Sourou

Composition du Jury:

Président :	M.	SESS Daniel (Professeur UFR/SM Côte d'Ivoire)
Directeur :	Mme	DOSSO-BRETIN Mireille (Professeur UFR/SM Côte d'Ivoire)
Codirecteur :	Mme	FAYE-KETTE Hortense (Maître de Conférences Agrégé UFR/SM Côte d'Ivoire)
Rapporteur	M.	DIAFOUKA François (Maître de Conférences UFR/SPB Côte d'Ivoire)
Membres :	Mme	BAKAYOKO-LY Ramata (Professeur UFR/OS Côte d'Ivoire)
	M.	ASSA Ayémou (Professeur UFR/STRM Côte d'Ivoire)

DEDICACES

A Mon Seigneur Mon Dieu

*Merci pour toutes tes œuvres et que ta volonté soit faite
des les cieux et sur terre.*

Amen !

A tous les membres de la grande famille BANKOLE au Bénin

Puisse Le Seigneur vous combler et donner le repos éternel à tous nos défunts.

A mon père et à ma mère

Bénédictio et grâce divines à vous .Je vous souhaite une très bonne santé.

A toi Laurence.

Tu as toujours partagé mes peines et m'as encouragé sur la voie de la réussite.

Mon attachement.

A Farelle-Axelle et Merline-Arielle.

En plaçant tous mes espoirs en vous que vous ferez mieux.

A tous mes frères et sœurs.

Mes sentiments.

A mes oncles Pascal BANKOLE et Emmanuel BANKOLE sans oublier tantie

Hortense BANKOLE.

Toutes mes reconnaissances pour votre soutien moral.

REMERCIEMENTS

A la famille Gabriel KAKOU à Abidjan.

Pour la sympathie et l'amour qu'elle m'a témoignés pendant tout mon séjour à Abidjan

A monsieur le Professeur Martin AKOGBETO, Directeur du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC) au Bénin.

Pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté le parrainage de ma thèse
Considérations

A André TEHE, Léa ALI NAPO, Kouakou KONAN, Simonne WASSOUBOU et Jeannine HILLAH.

Mes gratitudees

A messieurs les Professeurs Simon AKPONAN et Séverin ANAGONOU des Facultés des Sciences de la Santé des universités d'Abomey-Calavi et de Parakou au Bénin.

A monsieur Kokou YOVO, ancien Directeur de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC) au Bénin.

Mes remerciements

A tous les personnels enseignant et technique du Département des Techniques de Biologie Humaine de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (Bénin).

Que ce modeste travail vous honore

A tous mes anciens formateurs et en particulier à messieurs Hospice SECLONDE, Adolphe TOPANOU et Simplicie LOKO.

Sincères reconnaissances

A Saliou ADEBO et Mamoudou ADEBO.

Pour vos soutiens moral et financier. Le bienfait n'est jamais perdu.

A Frédéric LINO, François HOUNSOU, Wilfried DAKPOGAN, Alexandre DJEDJI et Mansourou SOUMANOU.

A mes compatriotes d'Abidjan notamment : Ignace AHOUANSOU, Emilienne AHOUANSOU, Joseph DEGUENON, Luc DOSSOU, Euloge da SILVA, Jean-Marie SAIZONOU, Apollinaire AHOUANGONOU, Rosette HONVO, Laté LAWSON, Justin KIKISSAGBE, Edmond KIKISSAGBE, Mathias SINGBO, Bernard MASSOULOKONON, Crépin MONTCHO, Flore GOMEZ, Bernadette LOGBO, Antoine SEVEGNON, Parfait HOUNKANRIN et le grand frère Cyprien DOSSOU.

Meilleurs souvenirs

A Euloge EKAZA.

Cher « Coach », ton ardeur et ta dextérité dans les manipulations de Biologie Moléculaire sont impressionnantes et font de toi un excellent chercheur.

Toutes mes reconnaissances

A César ONIANGUE et Thomas d'Aquin TONI.

A tous les Doctorants du laboratoire de Microbiologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et de l'Unité de Formation et de Recherches des Sciences Médicales d'Abidjan particulièrement à Véronique AKRAN, Jean-Claude BINI, Edith DIBOBE, Fatou SORO, Jean-Claude ANNE et Adjétey AKOVI.

Souvenir amical.

*A mes collègues béninois en stage à l'université de Cocody (Abidjan) :
Nestor SANTOS, Nicolas ATREVI, Servais GANDJI, Noël DESSOUASSI.
Courage, la fin est proche.*

*A Blaise ACHO, Samir BOUZID, Marcel KONAN, Mireille TRE-YAVO et Kelly
KOTCHI.
Mes gratitudes pour votre contribution.*

*A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Institut
Pasteur de Côte d'Ivoire et de l'Unité de Formation et de Recherche des
Sciences Médicales de l'université d'Abidjan : Chantal AKOUA-KOFFI, Adèle
N'DOUBA, Alphonsine M'BENGUE, Lazare ADOU, Pierre EHUIE, Serges
LOBA, Souleymane BAKAYOKO, Raymond N'GUESSAN, Nathalie
GUESSEND, Valerie GBONON, Alphonse N'GBAKOU, Hortense SECK,
Lassina BAMBA, Fofana KOUAKOU, Hélène SABLÀ, Irmine NAHOUA,
Germain KAROU, Clarisse KOUAME, Thomas DADIE avec mention spéciale
aux aînés Pascal Amian KOUA, Narcisse N'TAKPE, Koffi KOUAKOU, Jean
TAHOU et Emile ZOZAN.*

Pour les bons moments passés ensemble.

*A tous ceux et toutes celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation
de ce travail et que j'ai oublié de nommer.*

A notre Président de jury Monsieur le Professeur Daniel SESS.

Professeur Titulaire et Chef du Service de Biochimie Médicale à l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences Médicales d'Abidjan.

Vous avez bien voulu nous faire l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Vos qualités humaines nous ont toujours émerveillé. Nous vous prions d'accepter Monsieur le Professeur, nos reconnaissances.

A notre Directeur de thèse, Madame le Professeur Mireille DOSSO-BRETIN.

Professeur Titulaire, Chef du Département de Microbiologie à l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences Médicales d'Abidjan, Chef de Service au Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Responsable de la formation doctorale en Biologie Humaine Tropicale.

Vous nous avez inspiré ce sujet dont l'importance en santé publique n'est plus à démontrer. Vous avez mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour sa réalisation et vous nous avez précieusement et objectivement guidé dans sa rédaction. A tous les moments difficiles que nous avons connus au cours de ce travail, vous avez été toujours présente pour nous galvaniser le moral par vos sages conseils.

Nous vous prions d'accepter, Madame le Professeur, nos profondes gratitude.

A notre Codirecteur de thèse Madame le Professeur Hortense KETTE-FAYE.

Maître de Conférences Agrégé à l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences Médicales d'Abidjan et Chef du laboratoire de Bactériologie au Centre Hospitalier et Universitaire de Yopougon.

Vous avez pris la codirection de nos travaux de recherche. A aucun moment vous n'avez marchandé votre disponibilité. Votre contribution a été pour nous un grand réconfort dans la réalisation de ce travail. Soyez en remerciée et veuillez trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre membre de jury Madame le Professeur Ramata LY-BAKAYOKO.

Professeur Titulaire à l'Unité de Formation et de Recherche d'Odontostomatologie d'Abidjan et Vice-Présidente de l'Université de Cocody.

Malgré vos nombreuses occupations, vous avez bien voulu accepter de participer à ce jury pour juger ce travail. Nous vous prions d'accepter Madame le Professeur nos reconnaissances.

A notre membre de jury Monsieur le Professeur Ayémou ASSA

Professeur Titulaire à l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la terre et des ressources minières d'Abidjan, Directeur du Service Recherche et Valorisation de l'Université de Cocody.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en prenant part à ce jury. Votre spontanéité et votre geste de bienveillance le jour de notre accueil dans votre bureau nous ont fait plaisir.

Nous vous prions Monsieur le Professeur, d'accepter toutes nos considérations

A notre membre de jury Monsieur le Professeur François DIAFOUKA.

Maître de Conférences, Praticien Hospitalier et Vice-Doyen de l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan.

Nous vous avons connu dès le début de notre formation en DEA de Biologie Humaine Tropicale. C'est avec satisfaction que nous vous prions de juger ce travail. Veuillez bien accepter Monsieur le Professeur, nos sincères reconnaissances.

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
Ca⁺⁺	Ion calcium
CE	Corps élémentaire
CI	Corps intermédiaire
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CR	Corps réticulé
CRP	Protéine riche en cystéine
DC	Domaine constant
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DV	Domaine variable
ECBP	Eukariotic cell binding protein
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EIA	Enzyme immuno assay
GAG	Glycosaminoglycane
GLXA	Antigène glycolipidique soluble
GMPc	Guanidine monophosphate cyclique
Hsp	Heat shock protein
IFD	Immunofluorescence directe
IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IST	Infections sexuellement transmissibles
K⁺	Ion potassium

kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
kpb	Kilopaire de base
LCR	Ligase chain reaction
LGV	Lymphogranulomatose vénérienne
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molaire
MEM	Milieu essentiel minimum
MIF	Microimmunofluorescence
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimole
MOMP	Major outer membrane protein
Na⁺	Ion sodium
nm	Nanomètre
OMP	Outer membrane protein
PAP	Papanicolaou
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Salin
Pc	Pour cent
PCR	Polymerase chain reaction
Pju	Premier jet d'urines
pM	Picomole
pm	Pour mille
PMME	Protéine majeure de la membrane externe
PN	Polynucléaire neutrophile
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
Se	Sensibilité

Sp	Spécificité
TAE	Tris Acétate EDTA
Taq	Thermotoccus aquaticus
TBE	Tris Borate EDTA
UFI	Unité formant inclusion
UV	Ultra violet
v/v	Volume par volume
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
2SP	2Sucrose-phosphate
4SP	4Sucrose-phosphate

**LISTE DES TABLEAUX
ET DES FIGURES**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques des différentes espèces du genre *Chlamydia* [Cox *et al.*, 1988 ; Storey *et al.*, 1993]^(50, 197)

Tableau II : Principales propriétés des corps élémentaires (CE) et des corps réticulés (CR) [Eb, 1999]⁽⁶⁵⁾

Tableau III : Principaux antigènes des *Chlamydia* [Eb, 1999]⁽⁶⁵⁾

Tableau IV : Localisation des domaines variables (DV) dans la séquence en acides aminés de la protéine majeure de la membrane externe

Tableau V : Valeurs et écarts des CMI et CMB des antibiotiques indiqués sur *Chlamydia trachomatis* [Scieux *et al.*, 1990 ; Welsh *et al.*, 1992 ; Jones *et al.*, 1997 ; Dessus-Babus *et al.*, 1998]^(186, 223, 102, 58)

Tableau VI : Répartition des échantillons biologiques en fonction de la recherche effectuée

Tableau VII : Composition du milieu de transport et de conservation des échantillons [Rodriguez *et al.*, 1991]⁽¹⁷¹⁾

Tableau VIII : Composition des milieux utilisés pour la culture de la lignée cellulaire Mac Coy et la culture de *Chlamydia trachomatis* sur celle-ci [Rodriguez *et al.*, 1991]⁽¹⁷¹⁾

Tableau IX : Différents bains utilisés pour la réalisation de la coloration de Papanicolaou

Tableau X : Séquences nucléotidiques des amorces CTU et CTL [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾

Tableau XI : Différents fragments obtenus après hydrolyse par *AluI* des produits d'amplification des souches de références [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾

Tableau XII : Répartition des échantillons biologiques selon l'aspect macroscopique et le résultat de la culture cellulaire

Tableau XIII : Répartition des causes de la non interprétation des résultats de la culture des échantillons

Tableau XIV : Répartition des échantillons biologiques ayant donné à la culture des résultats interprétables

Tableau XV : Répartition des inclusions en fonction de leur taille et leur nombre d'unités formant inclusion (UFI) par ml

Tableau XVI : Répartition des inclusions en fonction de l'aspect macroscopique des échantillons positifs

Tableau XVII : Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales

Tableau XVIII : Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales chez les hommes

Tableau XIX : Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales chez les femmes

Tableau XX : Répartition des échantillons en fonction de la richesse en corps élémentaires

Tableau XXI : Répartition des échantillons en fonction des résultats obtenus à l'immunofluorescence et à la coloration de Papanicolaou

Tableau XXII : Performances de la coloration de Papanicolaou

Tableau XXIII : Fréquence des réactions inflammatoires du col avec l'infection à *Chlamydia trachomatis* dans la population d'étude

Tableau XXIV : Fréquence des réactions inflammatoires du col avec l'infection à uniquement *Chlamydia trachomatis* dans la population d'étude

Tableau XXV : Fréquence des réactions inflammatoires du col avec l'infection à uniquement autres agents d'infections sexuellement transmissibles dans la population d'étude

Tableau XXVI : Autres agents d'infections sexuellement transmissibles détectés par la coloration de Papanicolaou versus coloration de GRAM

Tableau XXVII : Performances de la détection des immunoglobulines A endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* dans le diagnostic de la chlamydie

Tableau XXVIII : Performances de la détection des immunoglobulines totales endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* dans le diagnostic de la chlamydie

Tableau XXIX : Répartition des échantillons contenant des immunoglobulines A endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* en fonction de la recherche des immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis*

Tableau XXX : Répartition des échantillons contenant des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* en fonction des facteurs épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de la population d'étude

Tableau XXXI : Résultat de la détection d'ADN de *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de sécrétions génitales de la population d'étude

Tableau XXXII : Répartition des échantillons biologiques en fonction des différents génotypes observés

Tableau XXXIII : Répartition des génotypes identifiés en fonction des types d'échantillons biologiques

Tableau XXXIV : Répartition des génotypes identifiés en fonction des trois complexes définis par Yuan [Yuan *et al.*, 1989]⁽²²⁸⁾

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Parenté des Chlamydia basée sur le domaine I du gene de l'ARN ribosomal 23 S [Everett *et al.*, 1997]⁽⁶⁹⁾

Figure 2 : Cycle de développement des Chlamydia [Eb, 1999]⁽⁶⁵⁾

Figure 3 : Structure de la protéine majeure de membrane externe [Baehr *et al.*, 1988]⁽⁶⁾

Figure 4 : Plaque en « Luxlon » de 24 puits pour culture cellulaire

Figure 5 : Résultat négatif (tapis cellulaire sans inclusions cytoplasmiques).
Grossissement X400.

Figure 6 : Résultat positif (présence d'inclusions cytoplasmiques fluorescentes « vert-pomme »). Grossissement X400.

Figure 7 : Résultat positif (présence d'au moins 5 CE à l'immunofluorescence directe). Grossissement X400.

Figure 8 : Cellules génitales féminines infectées par *Chlamydia trachomatis*
Grossissement X400.

Figure 9 : Cellules génitales abondamment infectées par *Chlamydia trachomatis* Grossissement X400.

Figure 10 : Electrophorégramme montrant l'analyse en gel d'agarose à 0,8 pc des produits d'amplification de l'ADN de *Chlamydia trachomatis* extrait de différents échantillons biologiques

Figure 11 : Electrophorégramme montrant les profils de digestion enzymatique par *AluI* après migration en gel d'agarose à 3 pc en TAE des produits d'amplification des gènes *omp1* de *C. trachomatis* à partir des échantillons biologiques n°1 à 15 positifs à la PCR

Figure 12 : Electrophorégramme montrant les profils de digestion enzymatique par *AluI* après migration en gel d'agarose à 3 pc en TAE des produits d'amplification des gènes *omp1* de *C. trachomatis* à partir des échantillons biologiques n°16 à 31 positifs à la PCR

Figure 13 : Electrophorégramme montrant les profils de digestion enzymatique par *AluI* après migration en gel d'agarose à 3 pc en TAE des produits d'amplification des gènes *omp1* de *C. trachomatis* à partir des échantillons biologiques n°32 à 45 positifs à la PCR

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	1
A - PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. HISTORIQUE, TAXONOMIE, CONSIDERATIONS PHYLOGENETIQUES DES CHLAMYDIA	5
1. HISTORIQUE	5
2. TAXONOMIE	6
2.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	6
2.2. <i>Chlamydia psittaci</i>	7
2.3. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	8
2.4. <i>Chlamydia pecorum</i>	8
3. CONSIDERATIONS PHYLOGENETIQUES	11
II. BIOLOGIE DES CHLAMYDIA	14
1. MORPHOLOGIE ET CARACTERES BIOCHIMIQUES	14
1.1. Corps élémentaires	14

1.2. Corps réticulés	15
1.3. Corps intermédiaires	15
2. CYCLE DE DEVELOPPEMENT	17
2.1. Adhésion	19
2.2. Pénétration des corps élémentaires dans la cellule	20
2.3. Inhibition de la fusion phagolysosomiale et modification du cytosquelette cellulaire	20
2.4. Transformation des corps élémentaires en corps réticulés	21
2.5. Multiplication	22
2.6. Transformation des corps réticulés en corps élémentaires	22
2.7. Libération des corps élémentaires	23
2.8. Persistance	23
III. STRUCTURE ANTIGENIQUE DES CHLAMYDIA	25
1. LIPOPOLYSACCHARIDE OU LPS	26
2. PROTEINE MAJEURE DE MEMBRANE EXTERNE (PMME)	26

3. PROTEINE RICHES EN CYSTEINE (CRP)	29
4. PROTEINES DE STRESS OU HEAT SHOCK PROTEINS	29
5. EUKARYOTIC CELL BINDING PROTEINS (ECBP)	30
6. AUTRES PROTEINES	30
6.1. Antigène glycolipidique soluble (GLXA)	30
6.2. Chez <i>Chlamydia trachomatis</i>	30
6.3. Chez <i>Chlamydia pneumoniae</i> et <i>Chlamydia psittaci</i>	30
IV. CARACTERISTIQUES GENOMIQUES	31
1. ETUDE DU CHROMOSOME	31
1.1. Généralités	31
1.2. Organisation génétique	32
2. PLASMIDE	32
V. DETECTION ET IDENTIFICATION DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	33
1. DETECTION	33

1.1. Produits biologiques	33
1.1.1. <i>Secrétions endocervicales</i>	33
1.1.2. <i>Secrétions urétrales</i>	34
1.2. Différentes techniques de détection	34
1.2.1. <i>Méthodes conventionnelles</i>	34
1.2.1.1. Culture cellulaire	34
1.2.1.2. Méthodes de détection d'antigènes	36
1.2.1.2.1. Recherche des inclusions de <i>C. trachomatis</i> sur frottis	36
1.2.1.2.2. Techniques immunoenzymatiques	37
1.2.2. <i>Méthodes modernes</i>	37
1.2.2.1. Sondes d'hybridation	37
1.2.2.2. Amplification génique	37
1.2.3. <i>Méthodes sérologiques</i>	38
1.2.3.1. Réaction de fixation du complément	38

1.2.3.2. Micro-immunofluorescence (MIF)	38
1.2.3.3. Tests EIA sérologiques	39
1.2.3.4. Autres tests sérologiques	39
2. CARACTERISATION DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	39
2.1. Sérotypage	40
2.2. Génotypage par l'étude de <i>Omp1</i>	40
2.3. Autres méthodes de génotypage	41
VI. SENSIBILITE DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> AUX ANTIBIOTIQUES	42
B - DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	45
I. MATERIELS	45
1. TYPE D'ETUDE	45
2. PRODUITS BIOLOGIQUES	45
2.1. Critères d'inclusion	46
2.2. Critères d'exclusion	47

2.3. Qualité des échantillons biologiques et diagnostic microbiologique de la chlamydirose	47
II. METHODES	48
1. PROTOCOLE TECHNIQUE	48
1.1. Culture cellulaire et méthodes alternatives de détection de <i>Chlamydia trachomatis</i>	48
1.1.1. Culture cellulaire	48
1.1.1.1. <i>Traitement des échantillons</i>	48
1.1.1.2. <i>Entretien de la lignée cellulaire Mac Coy</i>	49
1.1.1.3. <i>Conservation des cellules</i>	51
1.1.1.4. <i>Isolement de C. trachomatis à partir des échantillons</i>	51
1.1.1.5. <i>Conservation des isolats de C. trachomatis</i>	54
1.1.2. Détection de <i>C. trachomatis</i> dans les échantillons de premier jet d'urines	54
1.1.2.1. <i>Traitement des échantillons</i>	54
1.1.2.2. <i>Recherche des corps élémentaires de C. trachomatis</i>	55

1.1.3. Détection de <i>C. trachomatis</i> par la coloration de Papanicolaou	55
1.1.3.1. <i>Traitement des échantillons</i>	55
1.1.3.2. <i>Recherche d'anomalies évocatrices d'infection à C. trachomatis par la coloration de Papanicolaou</i>	56
1.1.3.3. <i>Recherche des corps élémentaires de C. trachomatis</i>	57
1.1.4. Détection des immunoglobulines anti- <i>C. trachomatis</i>	57
1.1.4.1. <i>Traitement des échantillons</i>	57
1.1.4.2. <i>Recherche des immunoglobulines totales et des immunoglobulines A anti-C. trachomatis</i>	57
1.1.4.3. <i>Recherche de l'antigène chlamydien</i>	58
1.1.5. Détection de <i>C. trachomatis</i> par amplification génique	58
1.1.5.1. <i>Principe</i>	58
1.1.5.2. <i>Traitement des échantillons biologiques</i>	59
1.1.5.3. <i>Conditions de l'amplification</i>	60
1.1.5.4. <i>Mise en évidence des produits d'amplification</i>	61

1.2. Caractérisation des profils génomiques de <i>C. trachomatis</i> par la technique du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)	61
1.2.1. Principe	61
1.2.2. Traitement des amplicons	61
1.2.3. Digestion par <i>AluI</i>	62
1.2.4. Mise en évidence des produits d'hydrolyse	62
1.2.5. Détermination des différents géotypes	63
2. ANALYSE STATISTIQUE	63
C- TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	65
CHAPITRE I : RESULTATS	66
I. RESULTATS DES CULTURES CELLULAIRES	67
1. CULTURE CELLULAIRE ET ASPECT MACROSCOPIQUE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	69
2. CAUSES DE LA NON INTERPRETATION DES RESULTATS DE LA CULTURE	70

3. INFLUENCE DU SANG ET DE LA GLAIRE SUR LA POSITIVITE DES ECHANTILLONS AYANT DONNE A LA CULTURE DES RESULTATS INTERPRETABLES	72
4. TAILLE DES INCLUSIONS OBSERVEES ET ASPECT MACROSCOPIQUE DES ECHANTILLONS POSITIFS	73
II. UTILISATION DES METHODES NON NORMALISEES	76
1. ECHANTILLONS DE PREMIER JET D'URINES	76
1.1. Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines	78
1.2. Richesse en corps élémentaires et échantillons biologiques	80
2. COLORATION DE PAPANICOLAOU	82
2.1. <i>Chlamydia trachomatis</i> coloration de Papanicolaou et technique d'Immunofluorescence directe	84
2.2. <i>Chlamydia trachomatis</i> et aspect cytologique du col	86
2.3. Coloration de Papanicolaou et les autres agents d'infections sexuellement transmissibles	89
3. IMMUNOGLOBULINES « A » ENDOCERVICALES ANTI- <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	91

3.1. Immunoglobulines endocervicales anti-<i>C. trachomatis</i> et diagnostic de la chlamydie	91
3.2. Immunoglobulines A et immunoglobulines totales endocervicales anti-<i>C. trachomatis</i>	93
3.3. Immunoglobulines A endocervicales anti-<i>C. trachomatis</i> et caractéristiques de la population d'étude	94
4. DETECTION D'ADN DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> PAR LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE	95
III. GENOTYPAGE	97
1. DIFFERENTS GENOTYPES OBSERVES	101
2. GENOTYPES OBSERVES ET TYPES D'ECHANTILLONS	102
3. GENOTYPES OBSERVES ET DIFFERENTS COMPLEXES DEFINIS PAR YUAN	103
CHAPITRE II- DISCUSSION	104
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	124
ANNEXES	162

INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis est un microorganisme ubiquitaire à multiplication intracellulaire obligatoire. Il constitue l'un des principaux agents étiologiques des infections sexuellement transmissibles. Ces infections peuvent être aiguës superficielles à titre d'urétrites chez l'homme et de cervicites chez la femme. Elles peuvent constituer des portes d'entrée pour le virus de l'immunodéficience humaine. Elles peuvent également être chroniques : épидидymites et prostatites chez l'homme, salpingites et grossesses extra-utérines chez la femme. Ces infections compromettent les fonctions de reproduction.

Chlamydia trachomatis est également mis en cause dans les pneumonies et conjonctivites néonatales. Il est enfin, responsable du trachome, première cause de cécité dans le monde. Toutes ces pathologies représentent un problème grave de santé publique.

En Côte d'Ivoire, la bactérie présente des taux de prévalence élevés. En effet, les travaux de Sanon en 1992 [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾ ont montré des taux de prévalence de 13,7 pc chez les femmes et de 28,4 pc chez les hommes. De même, les enquêtes sérologiques réalisées par Faye-Ketté en 1996 [Faye-Ketté *et al.*, 1996a ; 1996b]^(71, 72) ont révélé un taux de 70 pc dans une population de femmes asymptomatiques et de 30 pc chez des femmes ayant une cervicite. De plus, le nombre de cas récidivants au traitement ne cesse de s'accroître.

Dans ce contexte, il est nécessaire de connaître la réalité au plan moléculaire de la bactérie en milieu ivoirien. Cela permettra tout d'abord de préciser les caractéristiques épidémiologiques, la biodiversité et la variabilité de la bactérie ; ensuite, d'évaluer les résultats thérapeutiques des cas diagnostiqués et des récives après traitement spécifique ; enfin, d'aboutir à long terme à la mise au point d'un moyen efficace pour la lutte préventive.

C'est la raison qui a sous-tendu le présent travail dont l'objectif général a été de caractériser les souches de *Chlamydia trachomatis* responsables d'infections génitales basses en Côte d'Ivoire après en avoir évalué quelques méthodes de détection.

Les objectifs spécifiques ont été :

- 1- détecter *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire, méthode de référence.
- 2- évaluer des méthodes non normalisées de détection de *Chlamydia trachomatis* notamment dans les échantillons de sécrétions génitales et de premier jet d'urines.
- 3- caractériser les souches de *Chlamydia trachomatis* isolées d'infections génitales à Abidjan, Côte d'Ivoire.

Après un bref rappel sur les caractéristiques biologiques des Chlamydia, tour à tour seront exposés : la méthodologie suivie, les résultats obtenus et la discussion qui en découle ; ensuite la conclusion et les perspectives que suscite ce travail. Enfin, une bibliographie complètera le document.

PREMIERE PARTIE
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. HISTORIQUE, TAXONOMIE, CONSIDERATIONS PHYLOGENETIQUES DES CHLAMYDIA

1. HISTORIQUE

En 1907, la première description d'inclusions intra-cytoplasmiques, dans des cellules épithéliales de patients atteints de trachome, est rapportée par Halberstaeder et Von Prowazek. Quelque temps après, ces mêmes auteurs découvrent des inclusions identiques au niveau du col utérin d'une mère et dans les cellules épithéliales conjonctivales de son nouveau-né [Halberstaeder *et al.*, 1907 ; 1909 ; Lindner, 1910]^(88, 89, 117).

Les mêmes inclusions sont décrites en 1924 dans les adénopathies de malades atteints de lymphogranulomatose vénérienne (LGV) [Gamma, 1924 ; Levaditi *et al.*, 1931]^(80, 116). En 1929, plusieurs cas de psittacose humaine après contact avec des perruches infectées sont rapportés [Bedson *et al.*, 1930]⁽²⁵⁾.

Le rapprochement entre les agents du trachome, de la conjonctivite à inclusions, de la lymphogranulomatose vénérienne et de la psittacose a été réalisé dès 1942 par Rake, Schaffer et Thygeson [Rake *et al.*, 1941 ; 1942]^(166, 167).

Longtemps considérés comme des parasites ensuite comme des virus, ce n'est qu'en 1966 que les Chlamydia sont connus comme étant des bactéries à développement intracellulaire.

Elles ont été successivement désignées, tour à tour sous les noms de : Bedsonia, Myagawanella, Neorickettsies... Tous ces noms proposés, ont été successivement abandonnés et remplacés par le nom Chlamydia [Moulder, 1966 ; Page, 1966]^(138, 150).

2. TAXONOMIE

Les *Chlamydia* appartiennent à l'ordre des Chlamydiales, qui ne comporte qu'une seule famille, les Chlamydiaceae et selon l'ancienne taxonomie un seul genre : le genre *Chlamydia* [Storz *et al.*, 1971 ; Moulder *et al.*, 1984 ; Eb, 1999]^(198, 141, 65).

Selon toujours l'ancienne taxonomie, le genre *Chlamydia* est composé de quatre espèces : *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* et *Chlamydia pecorum* [Page, 1968 ; Grayston *et al.*, 1989 ; Fukushi *et al.*, 1992]^(151, 83, 79).

2.1. *Chlamydia trachomatis*

L'espèce *Chlamydia trachomatis* rassemble des souches essentiellement humaines réparties en deux biovars : *trachoma* et *lymphogranuloma venereum* (LGV). Il existe également un biovar de la souris qui présente 50 pc d'homologie avec des souches humaines [Moulder *et al.*, 1984]⁽¹⁴¹⁾.

Récemment, des souches de *Chlamydia trachomatis* ont été isolées chez le porc et constituent un quatrième biovar [Storz *et al.*, 1994]⁽¹⁹⁹⁾. L'analyse des séquences des gènes codant les ARN ribosomiaux 16 S et 23 S a montré qu'il existe trois groupes génétiquement distincts au sein de l'espèce : un groupe constitué des souches humaines, un groupe des rongeurs (souris, hamsters) et un groupe porcin [Peterson *et al.*, 1997; Pudjiatmok *et al.*, 1997]^(156, 162).

La microtechnique en immunofluorescence a permis de sérotyper les souches humaines [Wang *et al.*, 1970]⁽²¹⁵⁾.

Actuellement, 18 sérovars sont individualisés ; 14 dans le biovar *trachoma* et 4 dans le biovar LGV. Les sérovars A, B, Ba et C sont isolés au cours du trachome cliniquement actif ; les sérovars D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J et K concernent des souches isolées d'infections oculaires et génitales ; les sérovars L1, L2, L2a et L3 correspondent à des souches de lymphogranulomatose vénérienne [Wang *et al.*, 1971 ; 1991]^(216, 217). Cette classification est basée sur la réactivité des épitopes portés par la protéine majeure de membrane externe (PMME) vis-à-vis d'anticorps polyclonaux et monoclonaux [Grayston *et al.*, 1975 ; Caldwell *et al.*, 1982]^(82, 40). L'analyse des communautés antigéniques de la PMME a entraîné le regroupement des souches de *Chlamydia trachomatis* en trois complexes : le complexe B (B, Ba, D, E, L1 et L2), le complexe C (A, C, H, I, J, K et L3) et le complexe intermédiaire (F et G) [Yuan *et al.*, 1989]⁽²²⁸⁾. Quelques souches récemment décrites sont non classées [Numazaki *et al.*, 1998]⁽¹⁴⁵⁾.

Le génotypage par analyse de restriction du gène *Omp1* codant pour la PMME a montré une corrélation avec les sérovars connus [Frost *et al.*, 1991 ; Sayada *et al.*, 1991]^(74, 179) et a permis de révéler des génovariants [Dean *et al.*, 1991 ; Morre *et al.*, 1998]^(54, 136). Les différences de séquence nucléotidique résultent de substitutions en acides aminés [Lampe *et al.*, 1993]⁽¹¹⁰⁾.

2.2. *Chlamydia psittaci*

Les oiseaux constituent le premier réservoir [Meyer, 1967]⁽¹³⁴⁾. Le second réservoir est constitué par les mammifères sauvages et d'élevage chez lesquels *Chlamydia psittaci* entraîne des avortements et des infections variées [Storz *et al.*, 1971]⁽¹⁹⁸⁾. L'homme représente un chaînon épidémiologique accidentel contaminé généralement par les oiseaux et beaucoup plus rarement par les mammifères [Orfila *et al.*, 1989]⁽¹⁴⁷⁾.

Les premiers sont à l'origine d'une pneumopathie, l'ornithose-psittacose [Ragnaud *et al.*, 1985]⁽¹⁶⁵⁾; les seconds entraînent des conjonctivites et des avortements [Schachter *et al.*, 1969 ; Herring *et al.*, 1987]^(181,97).

Des études d'hybridation ADN / ADN entre des souches d'oiseaux et de mammifères montrent une hétérogénéité génomique de l'espèce [Cox *et al.*, 1988 ; Fukushi *et al.*, 1989]^(50, 78). Quatre groupes ont été individualisés : les souches aviaires, les souches d'avortement des ruminants, les souches de chat, les souches de conjonctivite du cobaye.

2.3. *Chlamydia pneumoniae*

L'espèce *Chlamydia pneumoniae* rassemble des souches humaines responsables d'infections respiratoires aiguës et de manifestations chroniques [Grayston *et al.*, 1990 ; Weiss *et al.*, 1997]^(84, 222). La transmission est inter-humaine. L'espèce ne comporte qu'un seul sérovar humain [Black *et al.*, 1991]⁽³³⁾ reconnu par des anticorps monoclonaux de genre ou d'espèce [Kuo *et al.*, 1986]⁽¹⁰⁷⁾.

En dehors de l'homme, *Chlamydia pneumoniae* a été isolée chez le cheval [Sorey *et al.*, 1993]⁽¹⁹⁷⁾ et chez les koalas [Timms *et al.*, 1996]⁽²¹⁰⁾.

2.4. *Chlamydia pecorum*

Les souches de *Chlamydia pecorum* sont uniquement d'origine animale [Anderson *et al.*, 1996 ; Fukushi *et al.*, 1992]^(5, 79).

Chlamydia pecorum cause des infections variées systémiques chez les bovins, les ovins et les porcs. *Chlamydia pecorum* a également été isolée chez les koalas [Timms *et al.*, 1996]⁽²¹⁰⁾. L'espèce comporte au moins quatre biotypes et cinq sérovares [Storz *et al.*, 1994]⁽¹⁹⁹⁾.

Les principales caractéristiques des espèces du genre *Chlamydia* sont rapportées dans le tableau I page 9 [Cox *et al.*, 1988 ; Fukushi *et al.*, 1992 ; Storey *et al.*, 1993]^(50, 79, 197).

Tableau I : Caractéristiques des différentes espèces du genre *Chlamydia*

[Cox *et al.*, 1988 ; Fukushi *et al.*, 1992 ; Storey *et al.*, 1993]^(50, 79, 197).

Caractéristiques	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pecorum</i>
Hôtes naturels	Homme (souris, porc)	Homme (cheval, koala)	Oiseaux, mammifères	Mammifères
Inclusion :				
* morphologie	Arrondie , clairsemée	Ovale, dense	Diffuse, dense, multiple	Variable, dense
□ Glycogène	+	-	-	-
Caractères génétiques :				
* G + C pc	42 - 45	40,3	39 - 43	36,3
* pc homologie :				
- intra espèces	92 - 100 (50 avec biovar souris)	94 - 100	14 - 100	88 - 100
- inter espèces	< 10	< 10 (sauf souche cheval 69 - 73)	1 - 33	1 - 19
* plasmide	+ (7,5 kb)	- (souche cheval +)	quelques souches rares souches	?
* bactériophage	-	-		-
Groupes génétiques (ARNr)	3 (homme/souris /porc)	1	4 (oiseaux/ruminants /chat/cobaye)	1
- biovars	4 (<i>trachoma</i> /LGV/ souris/porc)	?	4	
- sérovars	<i>trachoma</i> : 14 LGV : 4	homme : 1	oiseaux : 5 à 9 ruminants : 1 chats : 1 cobaye : 1	Ruminants : ≥ 3 Porcs : 2

Une récente classification basée sur l'étude séquentielle des gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16 S et 23 S, divise la famille des Chlamydiaceae en deux genres : genre *Chlamydia* et genre *Chlamydophila* [Hartley *et al.*, 2001]⁽⁹⁰⁾ comportant respectivement 2 et 7 espèces.

Pour le genre *Chlamydia*, ce sont :

- *Chlamydia trachomatis* (regroupe les anciens biovars *trachoma* et *lymphogranuloma venereum*) ;
- *Chlamydia suis* (initialement appelée *Chlamydia trachomatis* biovar porc).

Pour le genre *Chlamydophila* on note :

- *Chlamydophila muridarum* (initialement *Chlamydia trachomatis* biovar souris) ;
- *Chlamydophila psittaci* (initialement *Chlamydia psittaci* souches des oiseaux) ;
- *Chlamydophila abortus* (initialement *Chlamydia psittaci* souches des mammifères) ;
- *Chlamydophila felis* (initialement *Chlamydia psittaci* souches de chat) ;
- *Chlamydophila caviae* (initialement *Chlamydia psittaci* souches de conjonctivite de cobaye) ;
- *Chlamydophila pneumoniae* (initialement *Chlamydia pneumoniae*) ;
- *Chlamydophila pecorum* (initialement *Chlamydia pecorum*).

Au nombre des neuf espèces qui composent ces deux genres cinq sont retrouvées dans les infections humaines.

Des organismes intracellulaires proches des *Chlamydia* ont été récemment décrits.

Les souches “ Z ” (genre *Simkania*) ont la morphologie des *Chlamydia* [Kahane *et al.*, 1995]⁽¹⁰⁴⁾ mais, l’analyse des séquences des gènes 16 S et 23 S indique que les genres *Simkania* et *Chlamydia* sont des taxons séparés [Everett *et al.*, 1997 ; Pudjiatmok *et al.*, 1997]^(67, 162).

Des parasites coccoïdes d’amibes *Acanthamoeba* isolées du mucus nasal de l’homme ont des séquences d’ARN ribosomal 16 S qui les rapprochent des *Chlamydia*. Cependant, avec seulement un pourcentage d’homologie de 86 à 87 pc, ces bactéries “ *Candidatus para-Chlamydia acanthamoebae* ” constitueraient un nouveau genre dans la famille des *Chlamydiaceae* [Amann *et al.*, 1997]⁽³⁾.

3. CONSIDERATIONS PHYLOGENETIQUES

La classification phylogénétique des êtres vivants par l’étude des séquences de l’ARN ribosomal 16 S montre que les *Chlamydia* sont des eubactéries et constituent un phylum homogène à part, proche des planctomyces [Weisburg *et al.*, 1986]⁽²²¹⁾. Bien qu’ayant de nombreuses ressemblances avec le genre *Rickettsia* et le genre *Ehrlichia*, les *Chlamydia* en sont génétiquement très éloignés.

Les relations phylogénétiques au sein du genre *Chlamydia* déterminées par comparaison des séquences du gène codant l’ARN ribosomal 16 S montrent huit groupes distincts rassemblés en deux ensembles. Le premier est composé de *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* (trois groupes) et *Chlamydia pecorum*, et le second est constitué de *Chlamydia trachomatis* avec trois groupes génétiques [Pudjiatmok *et al.*, 1997]⁽¹⁶²⁾. Dans une autre étude, le premier ensemble est constitué de *Chlamydia pneumoniae* et le second de *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum* et *Chlamydia trachomatis* [Peterson *et al.*, 1997]⁽¹⁵⁶⁾.

L'analyse de l'espace intergénique 16 S / 23 S et du domaine I du gène codant pour l'ARN ribosomal 23 S aboutit également à deux ensembles (le premier correspondant à *Chlamydia trachomatis* et le second aux trois autres espèces) avec neuf groupes génétiques distincts ; *Chlamydia psittaci* en comporte quatre [Everett *et al.*, 1997]⁽⁶⁷⁾ (figure 1 page 13).

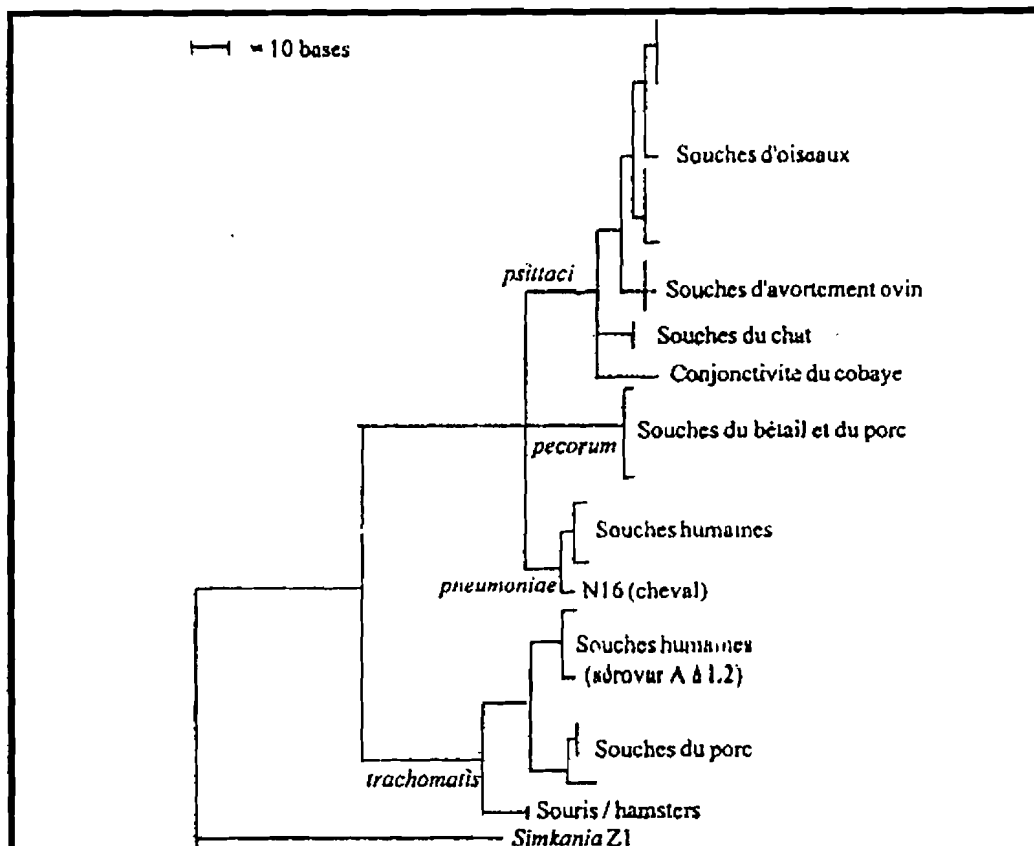


Figure 1 : Parenté des *Chlamydia* basée sur le domaine I du gène de l'ARN ribosomal 23S [Everett *et al.*, 1997]⁽⁶⁹⁾

II. BIOLOGIE DES CHLAMYDIA

1. MORPHOLOGIE ET CARACTERES BIOCHIMIQUES

Au microscope électronique, les Chlamydia se caractérisent par deux types de corps morphologiquement distincts : les corps élémentaires et les corps réticulés [Lepinay *et al.*, 1970 ; Matsumoto, 1979]^(114, 130).

1.1. Corps élémentaires (CE)

Les corps élémentaires adaptés au transit extracellulaire, constituent la forme infectieuse chez les Chlamydia et incapables de se multiplier. De forme sphérique, les CE sont rigides et mesurent 0,250 à 0,350 μm de diamètre. Ils sont caractérisés par une zone dense aux électrons, para-centrale, appelée nucléoïde contenant un ADN de 6 à 11.10^5 paires de bases [Ward, 1983]⁽²¹⁹⁾. Deux protéines comparables aux histones ont été décrites chez *Chlamydia trachomatis* et sont probablement responsables de cette structure [Peterson *et al.*, 1996]⁽¹⁵⁵⁾. Ils contiennent également une zone granuleuse riche en ribosomes et des granulations polysaccharidiques [Lepinay *et al.*, 1970]⁽¹¹⁴⁾.

Les corps élémentaires sont limités par deux systèmes membranaires trilamellaires de 80 Anström d'épaisseur chacun. La membrane interne correspond à la membrane cytoplasmique. La membrane externe est granuleuse ; sur sa face interne est observable un maillage hexagonal régulier fait de sous unités protéiques de 18 nm de diamètre [Chang *et al.*, 1982]⁽⁴³⁾.

Bien que la paroi des CE ressemble à celle des bactéries à Gram négatif, il n'existe aucune structure ressemblant au peptidoglycane et à l'acide muramique [Barbour *et al.*, 1982]⁽¹²⁾. Des projections externes en forme de pointe ou de bouton ont été mises en évidence ainsi que des canaux trans-membranaires [Matsumoto, 1982 ; Louis *et al.*, 1980]^(131, 120).

Ces structures pourraient jouer un rôle dans l'attachement des CE aux cellules hôtes et le transfert de substances nutritives.

1.2. Corps réticulés (CR)

Les corps réticulés constituent la seconde forme rencontrée dans le cycle des Chlamydia. De taille plus grande que les CE, de 0,6 à 1 μm de diamètre, les CR ont une forme plus irrégulière [Popov *et al.*, 1978]⁽¹⁶¹⁾. Ils sont entourés par deux systèmes membranaires trilamellaires, légèrement sinueux séparés par un espace clair d'environ 100 Anström. A la différence des CE, la paroi fine ne contient pas de ponts disulfures [Hatch *et al.*, 1984]⁽⁹²⁾. Des projections de surface ont également été observées [Matsumoto, 1982]⁽¹³¹⁾.

Il n'existe pas de nucléoïde mais un réseau lâche de filaments de 20 Anström d'épaisseur constitués d'ADN [Popov *et al.*, 1978]⁽¹⁶¹⁾. La zone périphérique est riche en granulations de 15 nm correspondant aux ribosomes. La quantité d'ARN est trois fois supérieure à celle de l'ADN alors que les CE contiennent presque les mêmes quantités [Becker, 1978]⁽²⁴⁾. Les CR, non infectieux, sont adaptés au milieu intracellulaire et sont incapables de survivre hors des cellules. Ce sont les formes métaboliquement actives des Chlamydia. Ils utilisent leurs propres ribosomes et enzymes pour leurs synthèses, mais dépendent de leur cellule hôte pour l'ATP et d'autres métabolites hautement énergétiques [Becker, 1978 ; Moulder, 1991]^(24, 142).

1.3. Corps intermédiaires (CI)

Lors de la transformation des CE en CR et de la transformation des CR en CE, les Chlamydia se présentent sous forme de corps intermédiaires (CI). D'un diamètre de 0,45 à 0,60 μm , ils sont limités par deux systèmes membranaires et caractérisés par un nucléoïde central.

Les principales propriétés des corps élémentaires et des corps réticulés sont résumées dans le tableau II.

Tableau II : Principales propriétés des corps élémentaires (CE) et des corps réticulés (CR) [Eb, 1999]⁽⁶⁵⁾.

Caractéristiques	CE	CR
Caractères généraux :		
- Diamètre (µm)	0,2 – 0,4	0,5 – 1,5
- Apparition dans le cycle de développement	tardive	précoce
- Caractères infectieux	+	-
- Multiplication intracellulaire	-	+
Paroi :		
- Rigidité	+	-
- Sensibilité à agression mécanique, choc osmotique, lyse trypsique	-	+
Acides nucléiques :		
- ADN	compact	dispersé
- Ratio ARN/ADN	1	3 – 4
- Ribosomes	rare	abondants
Métabolisme :		
- Synthèse d'ATP	-	-
- Système de transport ATP/ADP	-	+
- Synthèse des protéines dépendant de l'apport en ATP par la cellule-hôte	-	+

2. CYCLE DE DEVELOPPEMENT

Les Chlamydia se développent suivant un véritable cycle d'une durée de 48 à 72 heures (figure 2 page 18) [Puy *et al.*, 1989]⁽¹⁶³⁾.

In vivo, ils sont capables d'infecter les cellules épithéliales des muqueuses oculaires, génitales, pulmonaires et intestinales ainsi que les macrophages.

In vitro, les souches des Chlamydia sont généralement cultivées sur des cellules en lignée continue : cellules Mac Coy (cellules de liquide synovial humain) ou cellules Hela 229 (cellules épithéliales humaines du carcinome de col utérin) [Moulder, 1991 ; Schachter, 1988]^(142, 182). Le développement intracellulaire aboutit à la formation d'inclusions intracytoplasmiques caractéristiques des espèces :

- arrondies et clairsemées avec présence de glycogène chez *Chlamydia trachomatis* ;
- ovales et denses, sans glycogène chez *Chlamydophila pneumoniae* et *Chlamydophila pecorum* ;
- irrégulières et denses, sans glycogène chez *Chlamydophila psittaci*.

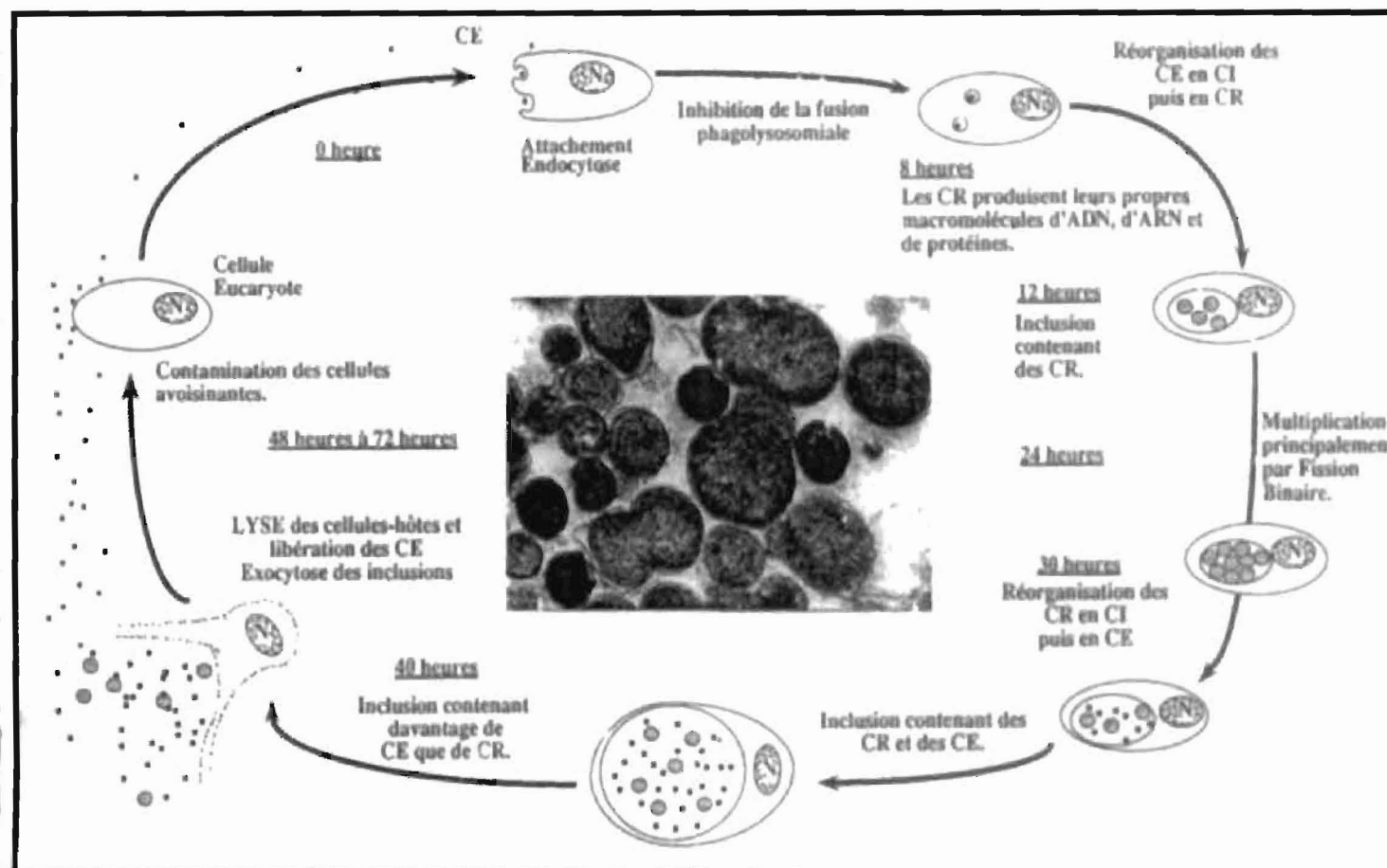


Figure 2 : Cycle de développement des Chlamydia [Eb, 1999]⁽⁶⁵⁾

2.1. Adhésion

Deux heures après l'inoculation, la plupart des CE sont associés avec les cellules hôtes. L'attachement des Chlamydia à la cellule constitue la phase initiale et serait en rapport avec des récepteurs spécifiques. L'adhésion serait d'abord basée sur des interactions électrostatiques non spécifiques [Hatch *et al.*, 1981]⁽⁹¹⁾ puis sur une ou plusieurs interaction(s) spécifique(s) de haute affinité [Bavoil, 1994]⁽²²⁾.

Grâce à des glycosaminoglycanes purifiés (GAG) et des lyases spécifiques de GAG, il a été démontré qu'une structure GAG semblable à l'héparane sulfate, présente à la surface des Chlamydia est nécessaire pour adhérer aux cellules hôtes [Zhang *et al.*, 1992]⁽²³⁰⁾.

D'autres molécules semblent intervenir dans l'attachement :

- la protéine majeure de la membrane externe (PMME) se comporterait comme une adhésine grâce à des interactions non spécifiques avec les cellules [Su *et al.*, 1990]⁽²⁰²⁾. Un composé glycosylé de la PMME est impliqué dans le contact étroit entre le CE et la cellule hôte [Swansson *et al.*, 1994]⁽²⁰³⁾ ;
- le lipopolysaccharide (LPS) est impliqué dans l'adhésion d'une manière non spécifique en altérant les propriétés physiques de la surface cellulaire [Nano *et al.*, 1985]⁽¹⁴³⁾ ;
- la protéine de stress hsp 70 pourrait interagir directement avec le ligand de la surface cellulaire ou présenter un ligand chlamydien dans un processus énergie-dépendant [Raulston *et al.*, 1993]⁽¹⁶⁹⁾ ;
- les " eukaryotic cell binding proteins " (ECBP) de 18 et 32 kDa présentes sur les CE ; des anticorps dirigés contre ces protéines inhibent l'association Chlamydia-cellule [Wenman *et al.*, 1986 ; Kaul *et al.*, 1987]^(224, 105) ;
- une cytoadhésine de 38 kDa [Joseph *et al.*, 1992]⁽¹⁰³⁾ ;

- une protéine riche en cystéine de 60 kDa ou OMP2 [Bavoil, 1994]⁽²²⁾.

In vitro, l'adhésion des corps élémentaires aux cellules est facilitée par une étape de centrifugation [Moulder *et al.*, 1984]⁽¹⁴¹⁾ et l'adhésion d'un sérovar de *Chlamydia trachomatis* est compétitivement inhibée par les autres sérovirs.

Les différents sérovirs de *Chlamydia trachomatis* s'attacheraient donc au même récepteur sur la membrane cellulaire [Vretou *et al.*, 1989]⁽²¹⁴⁾.

2.2. Pénétration des corps élémentaires dans la cellule

L'étape suivante est une ingestion par invagination de la membrane cellulaire, englobement par des pseudopodes puis internalisation des CE dans une vacuole [Friis, 1972]⁽⁷⁷⁾.

Deux facteurs interviennent dans l'ingestion : l'activation d'une lysolécithine qui favorise l'entrée des CE par accroissement de la fluidité membranaire et la GMP cyclique qui accroît l'aptitude de la membrane cellulaire à fusionner pour former une vacuole cytoplasmique [Ward *et al.*, 1982]⁽²¹⁸⁾. Un autre facteur important pour l'attachement et l'entrée des CE dans la cellule hôte est la concentration intracellulaire en Ca^{++} . L'utilisation d'un chélateur de cet ion sur des lignées cellulaires suscite des perturbations qui se traduisent ultérieurement par une diminution du nombre des inclusions. La diminution de la quantité d'ions Ca^{++} disponible entraîne une modification du réseau des filaments d'actine [Majeed *et al.*, 1993]⁽¹²⁵⁾.

2.3. Inhibition de la fusion phagolysosomiale et modification du cytosquelette cellulaire

Les *Chlamydia* échappent à la destruction par les lysosomes en empêchant la fusion phagosome-lysosome.

L'inhibition de la fusion dépend d'éléments présents dans l'enveloppe des CE intacts au moment de l'infection [Eissenberg *et al.*, 1983]⁽⁶⁷⁾.

Les CE inactivés par la chaleur ou neutralisés par des anticorps spécifiques, ainsi que les CR, peuvent être endocytés par des macrophages mais sont rapidement détruits. La présence permanente de la membrane des CE n'est cependant pas nécessaire puisque 8 à 12 heures après l'ingestion, la fusion n'a toujours pas lieu alors qu'il n'y a plus de CE dans la vacuole [Moulder, 1991]⁽¹⁴²⁾.

Le pH de l'endosome diminue à 6,2 avant de se stabiliser à 6,6. Cette variation est due vraisemblablement à la rétention de l'ATPase Na⁺/K⁺ endosomiale [Schramm *et al.*, 1996]⁽¹⁸⁵⁾.

La pénétration des CE déclenche une tyrosine phosphorylation des protéines épithéliales par des kinases [Birkelund *et al.*, 1994]⁽³¹⁾ qui entraîne une modification du cytosquelette de la cellule hôte. L'accumulation immédiate et locale de F-actine et de clathrine, ainsi que les microtubes, vont servir de guide pour entraîner les endosomes à CE dans la région périnucléaire [Schramm *et al.*, 1995 ; Clausen *et al.*, 1997]^(184. 49).

2.4. Transformation des corps élémentaires en corps réticulés

Après l'entrée dans la cellule hôte, il se produit dans les corps élémentaires, la synthèse de molécules d'ARN sous la dépendance d'une ARN polymérase ADN dépendant [Becker, 1978]⁽²⁴⁾. Les ponts disulfures sont réduits, libérant la PMME sous sa forme monomérique [Hatch *et al.*, 1986]⁽⁹⁴⁾.

Progressivement les CE se transforment par décondensation et augmentation de taille en CI puis en CR. Les CR acquièrent la capacité à synthétiser des protéines. Cette synthèse dépend d'une source exogène d'ATP [Hatch *et al.*, 1985]⁽⁹³⁾.

Lors de sa transformation en CR, le CE perd son pouvoir infectieux [Moulder, 1991]⁽¹⁴²⁾.

2.5. Multiplication

8 à 12 heures après l'infection, des populations presque pures de CR sont observées.

Dès que les CR matures sont apparus, l'activité métabolique augmente considérablement et la multiplication se produit par division binaire. Aux 18^{ème} et 24^{ème} heures, les CR forment une micro-colonie ou inclusion.

La membrane de phagocytose entourant le CE ingéré devient la membrane de l'inclusion qui s'agrandit en même temps que le nombre de CR augmente et que l'inclusion occupe un volume de plus en plus important dans le cytoplasme de la cellule hôte, refoulant le noyau à un pôle. La synthèse d'ARN est alors maximale [Schechter, 1966]⁽¹⁸³⁾.

2.6. Transformation des corps réticulés en corps élémentaires

A partir de la 20^{ème} heure réapparaissent des CI puis des CE. Ces changements s'accompagnent d'une diminution de la taille des CR, d'une condensation du nucléoïde et de la formation de membranes rigides. La condensation du chromosome serait due à l'action des deux protéines homologues (Hc1 et Hc2) qui induiraient d'abord un déroulement de l'ADN et une diminution de la transcription, de la traduction et de la réplication [Barry *et al.*, 1993]⁽¹⁶⁾. La synthèse des CRP de 12, 59 et 62 kDa coïncide avec la transformation des CR en CE.

La PMME et la CRP de 12 kDa présentent de plus en plus de ponts disulfures pendant les dernières 24 heures du cycle de développement [Hatch *et al.*, 1984 ; Newhall, 1987]^(92, 144).

Il n'y a pas de synchronisation dans la réorganisation des CR en CE. La conversion CR-CE serait à la fois sous le contrôle de la GMPc et de l'AMPc qui agiraient respectivement comme un stimulateur et un inhibiteur [Moulder, 1991] (142).

2.7. Libération des corps élémentaires

Entre la 48^{ème} et la 72^{ème} heures, les inclusions contiennent de nombreux CE et occupent tout le cytoplasme de la cellule hôte de manière caractéristique selon les espèces et les biovars. La membrane d'inclusion persiste jusqu'à un stade tardif de développement.

Les Chlamydia interrompent l'apoptose des cellules par induction du blocage de la libération de cytochrome C mitochondrial. Cette activité anti-mort programmée, garantit la suppression d'un mécanisme de défense cellulaire et une infection productrice [Fan *et al.*, 1998]⁽⁷⁰⁾.

L'évolution finale s'effectue selon diverses modalités liées ou non à la mort cellulaire [Moulder, 1991 ; Doughri *et al.*, 1972 ; Lepinay *et al.*, 1971]^(142, 60, 115) et aboutit à la libéralisation de 100 à plus de 1000 CE [Schachter, 1988]⁽¹⁸²⁾.

2.8. Persistance

Le cycle de développement peut être altéré *in vitro* par un retard de la maturation des CR et/ou une inhibition de la différenciation des CR en CE se traduisant par une persistance de formes morphologiquement anormales, viables mais non cultivables.

Cet état peut être observé dans certaines circonstances :

- en présence d'inhibiteur de la croissance bactérienne telle que l'aminoptérine qui empêche la réorganisation des CR en CE [Pollard *et al.*, 1963]⁽¹⁵⁹⁾, d'antibiotiques comme la pénicilline qui entraîne la formation de corps géants [Kramer *et al.*, 1971 ; Matsumoto *et al.*, 1970]^(106, 129) ;
- en l'absence de nutriments essentiels dans le milieu de culture tels que les acides aminés, la vitamine B, par blocage du développement des Chlamydia et des cellules hôtes [Allan *et al.*, 1983]⁽¹⁾ ;
- en présence de facteurs immunitaires tel que l'interféron gamma qui inhibe la maturation des CR en CE [Shemer-Auni *et al.*, 1987]⁽¹⁹⁰⁾.

La persistance peut également survenir en l'absence d'inhibiteurs ou de déficiences du milieu [Lee *et al.*, 1981 ; Moulder *et al.*, 1980]^(112, 139). Des cultures cellulaires peuvent être infectées de manière persistante :

- soit avec des inoculums faibles : à chaque cycle, suffisamment de nouvelles cellules sont infectées pour maintenir une présence chlamydienne, mais elles ne sont pas assez nombreuses pour menacer la culture cellulaire [Truant, 1981]⁽²¹¹⁾ ;
- soit au contraire avec des suspensions ayant un titre infectieux élevé [Manire *et al.*, 1959]⁽¹²⁶⁾. Plusieurs phénomènes peuvent contribuer à la survie de rares cellules hôtes pendant les périodes de multiplication extensive et à leur résistance à l'infection pendant la recroissance [Moulder *et al.*, 1982]⁽¹⁴⁰⁾.

La persistance de Chlamydia viables est observée également *in vivo* dans les infections chroniques [Beatty *et al.*, 1994]⁽²³⁾.

III. STRUCTURES ANTIGENIQUES DES CHLAMYDIA

Les antigènes des Chlamydia sont divers et déterminent des spécificités de genre, d'espèce, de sous-espèce et de sérovars. Ce sont des glycolipides ou des protéines et certains sont des éléments structuraux importants [Eb *et al.*, 1986 ; Hatch, 1999]^(63, 95) (tableau III).

Tableau III : Principaux antigènes des Chlamydia [Eb, 1999]⁽⁶⁵⁾.

Nature biochimique	Dénomination	Localisation	Poids moléculaire (kDa)	Spécificité	Références
Lipopolyoside	LPS	CE, CR	10	Genre	149- 153-159
Glycolipide	antigène soluble GLXA	périphérie des cellules-hôtes + CE	-	Genre	201
Protéines	PMME	CE- CR	38- 45	sérovar espèce genre	163- 168- 169
	CRP	CE	60/62	sérovar espèce	183- 184
		CE	15	sérovar espèce	183-185
	ECBP	CE	18- 31	Espèce	103- 194- 195
	hsp 60	CE- CR	57	genre espèce espèce	186-188
	75	CE	75		190-192
	Pomp	CR- (CE)	90-98	Espèce	202-203
	P 27 (<i>C. trachomatis</i>) *	CE- CR	27	Sérovar	164-196
	P 155 (<i>C. trachomatis</i>) *	CE	155	Espèce	164-198
P 30- P 76 (<i>C.pneumoniae</i>) **	CE	30/76	Espèce	200	

* *Chlamydia trachomatis*

** *Chlamydia pneumoniae*

1. LIPOPOLYSACCHARIDE OU LPS

Cet antigène majeur de surface est commun aux genres des Chlamydiaceae [Barwell, 1952 ; Stephens *et al.*, 1982]^(17, 193). Il a été mis en évidence au niveau du feuillet interne de la membrane externe des CR et des CE [Birkelund *et al.*, 1989]⁽²⁹⁾. Il s'agit d'un complexe glycolipidique [Dhir *et al.*, 1971]⁽⁵⁹⁾ dont la structure est proche du LPS des bactéries à Gram négatif [Nurminen *et al.*, 1985]⁽¹⁴⁶⁾.

Il est thermostable. Son analyse biochimique montre la présence de D-galactosamine, de D-glucosamine, d'acides gras 3-hydroxylés à longues chaînes, d'acide 3 céto-octulosonique et d'esters de phosphate [Nurminen *et al.*, 1985 ; Brade *et al.*, 1986]^(146, 36).

Le LPS chlamydien possède une activité endotoxinique faible [Lewis *et al.*, 1979]⁽¹¹⁸⁾.

2. PROTEINE MAJEURE DE MEMBRANE EXTERNE (PMME)

Appelée également major outer membrane protein (MOMP) ou outer membrane protein 1 (OMP1), elle représente environ 60 pc du poids sec des protéines de la membrane externe [Cadwell *et al.*, 1981 ; 1982]^(39, 40). Elle est exposée à la surface des CE et des CR et son poids moléculaire varie de 38 à 45 kDa suivant les espèces et les souches [Salari *et al.*, 1981]⁽¹⁷⁶⁾.

Cette protéine, présente durant tout le cycle de développement de la bactérie, joue un rôle structurale, dans le maintien de la rigidité de la membrane, et une fonction de porine [Bavoil *et al.*, 1984 ; Hackstadt *et al.*, 1985]^(20, 86).

La PMME comporte plusieurs déterminants antigéniques et possède ainsi une spécificité de genre, d'espèce, de séro groupe et de sérovar [Caldwell *et al.*, 1982 ; Stephens *et al.*, 1982 ; Zhang *et al.*, 1987]^(40, 193, 231).

Elle joue un rôle fondamental dans le diagnostic direct des infections dues aux *Chlamydia* par l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèce et de technique d'amplification génique, ainsi que dans le diagnostic sérologique à l'aide de la microtechnique en immunofluorescence et dans le typage des souches.

Le gène de la protéine majeure de membrane externe est *omp1*. Il code pour une structure comportant cinq domaines constants (DC) encadrant quatre domaines variables (DV).

Chez *Chlamydia trachomatis*, les localisations de ces domaines variables dans la séquence en acides aminés de la PMME sont indiquées dans le tableau IV.

Tableau IV : Localisation des domaines variables (DV) dans la séquence en acides aminés de la protéine majeure de la membrane externe (PMME).

Domaine Variable	Localisation
DV I	Résidus 64 à 83
DV II	Résidus 139 à 160
DV III	Résidus 224 à 237
DV IV	Résidus 288 à 317

Les DV sont exposés en surface de la membrane externe alors que les DC sont enchâssés dans la membrane (figure 3 page 28). Les DV I, DV II et DV IV contiennent des déterminants antigéniques qui entraînent la formation d'anticorps spécifiques de sérovar, de sous-espèce, de séro groupe ou d'espèce DV I et DV II montrent le plus grand nombre de variations de séquences [Baehr *et al.*, 1988 ; Caldwell *et al.*, 1982 ; Yuan *et al.*, 1989]^(6, 40, 228).

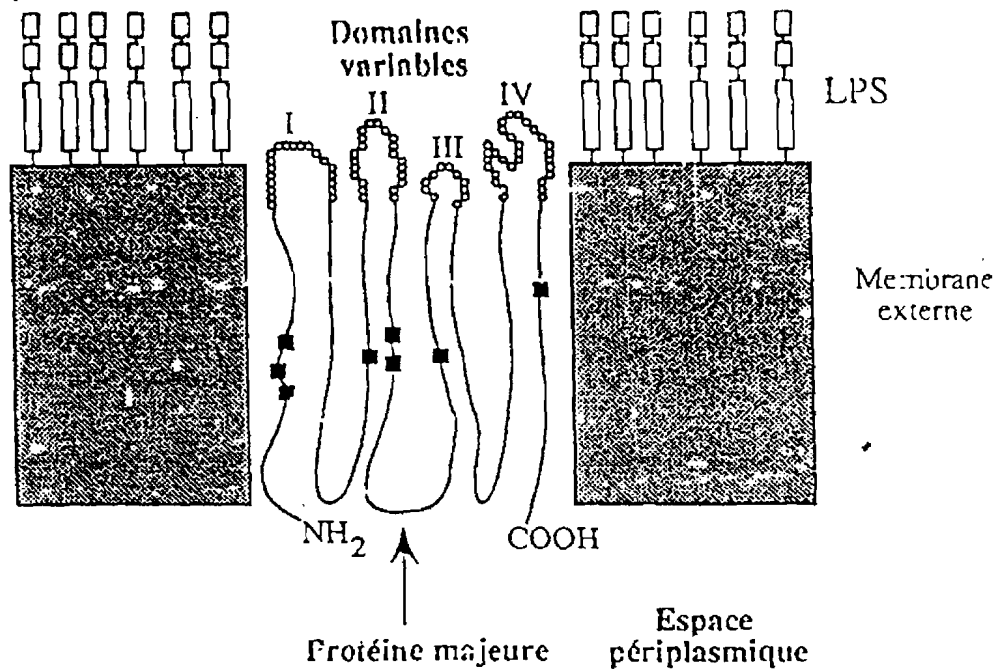


Figure 3 : Structure de la protéine majeure de membrane externe [Baehr *et al.* ; 1988]⁽⁶⁾

3. PROTEINES RICHES EN CYSTEINE (CRP)

Les CRP ne sont présentes que dans la membrane externe des CE [Allen *et al.*, 1990 ; Hatch *et al.*, 1986 ; Newhall, 1987]^(2, 94, 144). Elles sont au nombre de trois avec des poids moléculaires de 15, 60 et 62 kDa [Watson *et al.*, 1990]⁽²²⁰⁾.

La CRP de 60 kDa appelée encore OMP2 est exclusivement périplasmique [Everett *et al.*, 1995]⁽⁶⁸⁾. Les souches LGV de *Chlamydia trachomatis* possèdent les protéines de 60 et 62 kDa sous forme d'un doublet alors que les souches du biovar *trachoma* ne possèdent que l'une ou l'autre [Batteiger *et al.*, 1985]⁽¹⁸⁾. Elle est spécifique d'espèce.

La CRP de 15 kDa est appelée OMP3 chez *Chlamydia trachomatis*. Elle présente des épitopes spécifiques d'espèce et de sérovar [Puy *et al.*, 1989 ; Zhang *et al.*, 1987]^(163, 231).

Ces protéines jouent un rôle, en association avec la MOMP, dans la rigidité de la membrane. Elles semblent également fortement immunogènes lors d'infections naturelles.

4. PROTEINES DE STRESS (HEAT SHOCK PROTEINS [hsp])

Trois protéines de stress ont été identifiées : la hsp 60 de 57 kDa, la hsp de 75 kDa et la hsp d'environ 10 kDa.

La hsp 60 de 57 kDa est faiblement associée à la surface des CE et des CR. Elle présente des épitopes spécifiques de genre et d'espèce [Bavoil *et al.*, 1990 ; Yuan *et al.*, 1992]^(21, 229). Quant à la hsp de 75 kDa, elle a été extraite des CE et possède une spécificité d'espèce [Birkelund *et al.*, 1994]⁽³¹⁾.

5. "EUKARYOTIC CELL BINDING PROTEINS" (ECBP)

Les ECBP sont des protéines glycosylées de surface présentes sur les CE mais absentes ou en faible quantité chez les CR. *Chlamydia trachomatis* en présente deux : l'une de 18 kDa appelée chlanectine et l'autre de 27 à 32 kDa selon les sérovars [Hackstadt, 1986 ; Wenman *et al.*, 1986]^(87, 224). Ces protéines ne semblent pas être des antigènes majeurs [Wenman *et al.*, 1986]⁽²²⁴⁾.

6. AUTRES PROTEINES

6.1. Antigène glycolipidique soluble (GLXA)

Il a été isolé à partir de surnageant de cultures infectées. Il apparaît 36 heures après l'infection cellulaire [Stuart *et al.*, 1987]⁽²⁰⁰⁾. Il est spécifique de genre et entraîne des réactions d'hypersensibilité [Whitthum, 1996]⁽²²⁵⁾.

6.2. Chez *Chlamydia trachomatis*

Une protéine de 27 kDa spécifique de sérovar [Sacks *et al.*, 1979 ; Salari *et al.*, 1981]^(175, 176), une protéine thermolabile de 155 kDa spécifique de l'espèce [Caldwell *et al.*, 1977 ; Salari *et al.*, 1981]^(38, 176) et une autre protéine de 118 kDa spécifique des souches LGV [Mc Donald, 1985]⁽¹³³⁾ ont été isolées.

6.3. Chez *Chlamydophila pneumoniae* et *Chlamydophila psittaci*

Il s'agit des protéines de 98 kDa, 30 kDa, 76 à 80 kDa spécifiques de l'espèce *Chlamydophila pneumoniae* [Campbell *et al.*, 1990 ; Ladany *et al.*, 1989]^(41, 109) et des protéines de 90 à 95 kDa très immunogènes [Longbottom *et al.*, 1996]⁽¹¹⁹⁾ ayant une spécificité d'espèce chez *Chlamydophila psittaci*.

IV. CARACTERISTIQUES GENOMIQUES

1. ETUDE DU CHROMOSOME

1.1. Généralités

La taille du génome des Chlamydia et en particulier de *Chlamydia trachomatis* a été initialement estimée à 1000 kpb par microscopie électronique [Sarov *et al.*, 1969]⁽¹⁷⁸⁾. Quelques moments après, grâce à l'utilisation de la technique d'électrophorèse en champ pulsé cette taille a été évaluée à environ 1450 kpb, par analyse du génome total sous forme circulaire, non coupée [Frutos *et al.*, 1989]⁽⁷⁶⁾. Un peu plus tard, une étude menée toujours par électrophorèse en champ pulsée mais sur des fragments de restriction de l'ADN du sérovar L2 de *Chlamydia trachomatis* a ramené la taille à 1045 kpb [Birkelund *et al.*, 1992]⁽³⁰⁾, se rapprochant ainsi de celle donnée par Sarov *et al.* en 1969.

La teneur en bases G + C de *Chlamydia trachomatis* est évaluée aux environs de 42 à 45 pc [Cox *et al.*, 1988 ; Moulder *et al.*, 1984]^(50, 141) alors que cette valeur varie de 36,3 à 43 pc pour *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae* et *Chlamydophila pecorum* [Cox *et al.*, 1988 ; Fukushi *et al.*, 1992 ; Grayston *et al.*, 1989 ; Moulder *et al.*, 1984]^(50, 79, 83, 141), comme décrit dans le tableau I page 10.

Le degré d'homologie ADN/ADN existant entre les souches de *Chlamydia trachomatis* varie de 20 pc, entre les biovars pneumonie de la souris et LGV-trachoma, à 92-100 pc pour les souches humaines des biovars LGV et trachoma [Fukushi *et al.*, 1989 ; Moulder *et al.*, 1984]^(78, 141).

1.2. Organisation génétique

L'étude du génome de *Chlamydia trachomatis* a montré que les parties codantes étaient uniformément réparties sur le chromosome, sans duplication de grandes parties du génome, souvent rencontrées chez les bactéries [Birkelund *et al.*, 1992]⁽³⁰⁾.

Au nombre des gènes connus, le gène *omp1* code pour la MOMP. Ce gène présent en copie unique dans le génome [Stephens *et al.*, 1985]⁽¹⁹⁴⁾, est composé de quatre domaines variables encadrés par cinq domaines constants [Stephens *et al.*, 1987]⁽¹⁹⁵⁾, structure retrouvée au niveau de la MOMP [Baehr *et al.*, 1988]⁽⁶⁾.

L'expression du gène *omp1*, permettant de produire la MOMP tout au long du cycle de développement de *Chlamydia trachomatis*, serait régulée au niveau transcriptionnel, par des promoteurs en tandem [Stephens *et al.*, 1988a]⁽¹⁹⁶⁾.

2. PLASMIDE

La présence d'un plasmide cryptique de 7,5 kb a été démontrée dans quasiment toutes les souches de *Chlamydia trachomatis*. L'isolement de souches cliniques de *Chlamydia trachomatis* dépourvues de ce plasmide [An *et al.*, 1992 ; Peterson *et al.*, 1990b]^(4, 158), montre qu'il n'est pas nécessaire au caractère infectieux et au développement de la bactérie.

La séquence nucléotidique du plasmide de *Chlamydia trachomatis*, présent en une dizaine de copies par corps bactérien, a été déterminée [Hatt *et al.*, 1988 ; Hyypiä *et al.*, 1984 ; Palmer *et al.*, 1986 ; Sriprakash *et al.*, 1987]^(96. 99, 152, 192).

Elle semblerait conservée entre les souches des biovars *trachoma* et LGV, mais différerait de celle du plasmide du biovar pneumonie de la souris.

L'étude de la séquence du plasmide cryptique de *Chlamydia trachomatis* montre qu'il existe 16 cadres ouverts de lecture [Hatt *et al.*, 1988]⁽⁹⁶⁾, sans autre indication sur des fonctions éventuelles du plasmide [Sriprakash *et al.*, 1987]⁽¹⁹²⁾.

V. DETECTION ET IDENTIFICATION DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

1. DETECTION

1.1. Produits biologiques

Dans les cas d'infections génitales, *Chlamydia trachomatis* est généralement recherché à partir des échantillons de sécrétions urétrales chez l'homme et endocervicales chez la femme. Mais d'autres types d'échantillons peuvent être utilisés ; ce sont les urines, le sperme, le liquide de ponction, les biopsies....

La bonne sensibilité des techniques de détection et notamment de la culture cellulaire est conditionnée par la richesse en cellules des échantillons. Classiquement, on utilise des écouvillons en dacron, alginate de calcium ou des écouvillons en plastique ayant une extrémité en forme d'olive striée type "bactopick" ou en forme de petite brosse type "cytobrush".

1.1.1. Sécrétions endocervicales

Chez la femme, après la mise en place d'un spéculum et le mouchage du col avec une compresse stérile, le prélèvement est réalisé au niveau de la jonction exo-endocol en introduisant l'écouvillon de 1 à 2 cm dans l'endocol et en le retirant après rotation.

1.1.2. *Sécrétions urétrales*

Chez l'homme, le prélèvement s'effectue en introduisant l'écouvillon de 3 ou 4 cm au niveau de l'urètre antérieur et en lui faisant subir une rotation avant de le retirer.

Les échantillons destinés à la culture cellulaire sont placés dans un milieu de transport et de conservation. Le milieu de transport et de conservation par excellence est le milieu 2-sucrose-phosphate (2-SP) qui contient, en particulier, du sérum de veau fœtal et des antibiotiques sans action sur la réplication des *Chlamydia*. Ce milieu présente en outre l'intérêt de pouvoir être utilisé pour la recherche des *Chlamydia* par amplification génique, ce qui permet, à partir d'un même échantillon, de réaliser à la fois la culture et l'amplification génique [Dubuis *et al.*, 1997]⁽⁶¹⁾.

Les produits biologiques destinés à la culture sont impérativement et immédiatement placés à +4°C. Le temps de conservation doit être inférieur à 48 heures. Si un délai inférieur à 48 heures ne peut être respecté, l'échantillon doit alors être conservé à -80°C jusqu'à son inoculation sur lignée cellulaire.

1.2. Différentes techniques de détection

1.2.1. *Méthodes conventionnelles*

1.2.1.1. Culture cellulaire

Jusqu'à un passé récent, l'isolement de *Chlamydia trachomatis* en culture cellulaire était considéré comme la méthode de référence pour le diagnostic des infections urogénitales du fait de sa spécificité proche de 100 pc.

Chlamydia trachomatis a été isolé pour la première fois sur œuf embryonné de poule en 1935 [Dutilh *et al.*, 1987 ; Le Faou *et al.*, 1993]^(62, 113).

De nos jours, la culture se réalise par inoculation des échantillons biologiques sur des nappes cellulaires adhérentes au fond de plaques à puits.

Les cellules les plus couramment utilisées, permissives à l'infection, sont les lignées continues de cellules épithéliales Hela 229 ou Mac Coy.

La sensibilité de la culture est fortement augmentée par la centrifugation de l'inoculum sur les nappes cellulaires. Cette centrifugation permet une meilleure adhésion des CE aux nappes cellulaires et une modification de la perméabilité des cellules hôtes. L'inoculum doit ensuite être remplacé par du milieu de culture frais afin d'éviter son effet cytotoxique potentiel. La croissance intracellulaire de *Chlamydia trachomatis* est favorisée par la présence d'un antimétabolite dans le milieu de culture, la cycloheximide, qui bloque la réplication des cellules sans agir sur le cycle de réplication intracytoplasmique de *Chlamydia trachomatis*. Au bout de 48 à 72 heures d'incubation en atmosphère enrichie de 6,5 pc de CO₂ à 36,5°C, la croissance de la bactérie à l'intérieur d'une vacuole cytoplasmique est arrivée à maturité.

Elle peut être révélée, après fixation des nappes cellulaires, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux marqués ou par les colorations des inclusions par le Giemsa ou l'iode.

Les monoclonaux utilisés reconnaissent soit le LPS chlamydien et sont alors spécifiques du genre *Chlamydia*, soit la PMME ou la MOMP et sont alors spécifiques de l'espèce *Chlamydia trachomatis*. La lecture se fait au microscope inversé en lumière blanche ou en fluorescence suivant le marquage des anticorps monoclonaux.

La culture cellulaire est sensible à l'effet toxique des échantillons biologiques. Elle peut, malgré la présence d'antibiotiques et d'antimycosiques, être envahie par un microorganisme présent dans l'échantillon.

Enfin, elle ne permet l'isolement que de bactéries viables. Par ailleurs, il a été suggéré récemment que *Chlamydia trachomatis* puisse demeurer dans l'organisme sous une forme non répliquative échappant complètement à l'isolement sur culture cellulaire [Beatty *et al.*, 1994]⁽²³⁾.

1.2.1.2. Méthodes de détection d'antigènes

Nombreuses sont les techniques de détection d'antigènes de *Chlamydia trachomatis*, chacune possédant ses limites et ses contraintes.

1.2.1.2.1. Recherche d'antigènes sur frottis

a) Après coloration au Giemsa ou au Lugol

Les frottis réalisés à partir des écouvillons de prélèvement sont colorés au Giemsa ou au Lugol puis observés au microscope optique pour la mise en évidence des inclusions de *Chlamydia trachomatis* dans les cellules infectées. Cette technique est peu sensible et d'une lecture fastidieuse.

b) A l'immunofluorescence directe

Les frottis peuvent être également soumis à l'immunofluorescence qui elle, présente l'avantage d'un marquage spécifique des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Cette technique qui est d'une sensibilité et d'une spécificité excellentes, requiert une grande expérience car il s'agit d'identifier des corps élémentaires qui sont de minuscules petits points fluorescents de 250 à 350 nm de diamètre, en fonction de leur taille, forme et fluorescence .

1.2.1.2.2. Techniques immunoenzymatiques

Pour la détection en routine, de nombreuses techniques immunoenzymatiques sont commercialisées.

Elles sont basées sur la mise en évidence dans les échantillons cliniques, d'antigènes chlamydiens dont la présence est révélée par des techniques immunochimiques. Ces techniques sont de réalisation rapide et simple avec la possibilité d'automatisation qui permet de faire de grandes séries avec une lecture automatisée des résultats. L'inconvénient majeur des techniques immunoenzymatiques, est leur faible sensibilité notamment lorsque l'échantillon biologique est pauvre en bactéries.

1.2.2. Méthodes modernes

1.2.2.1. Sondes d'hybridation

La détection de *Chlamydia trachomatis* par hybridation moléculaire sans amplification est une méthode équivalente en sensibilité à un test immunoenzymatique [Beebe *et al.*, 1997 ; Bianchi *et al.*, 1998]^(26, 27). Elle a une bonne spécificité grâce à l'utilisation d'un test bloquant de confirmation des résultats positifs [Beebe *et al.*, 1997]⁽²⁶⁾.

1.2.2.2. Amplification génique

L'application de l'amplification génique à *Chlamydia trachomatis* a été largement développée. Cette méthode s'adapte parfaitement au diagnostic biologique des infections urogénitales à *Chlamydia trachomatis*.

Selon les techniques décrites, l'amplification génique cible le gène *omp1* [Dutilh *et al.*, 1987]⁽⁶²⁾, l'ADN plasmidique [Griffais *et al.*, 1989 ; Ostergaard *et al.*, 1990 ; 1991]^(85, 148, 149), les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16 S et 23 S [Claas *et al.*, 1990]⁽⁴⁷⁾. Elle peut se réaliser par LCR (Ligase Chain Reaction) ou par PCR (Polymerase Chain Reaction) dont aujourd'hui la PCR à temps réel, plus performante par son seuil de détection très bas.

L'amplification génique associe une très grande sensibilité, une grande spécificité à une bonne faisabilité et une reproductibilité des résultats.

1.2.3. Méthodes sérologiques

Elles présentent un intérêt lors d'infections profondes à *Chlamydia trachomatis*.

1.2.3.1. Réaction de fixation du complément

Cette méthode est peu sensible. Elle détecte des anticorps fixant le complément dirigé contre le LPS et ne permet donc pas de différencier les espèces de *Chlamydia* et de *Chlamydophila*.

1.2.3.2. Micro-immunofluorescence (MIF)

La MIF est actuellement la seule méthode sérologique valable pour sa sensibilité élevée et pour sa spécificité. Elle permet de titrer les différentes classes d'immunoglobulines IgG, IgA et IgM. Le principe consiste à mettre des dilutions successives du sérum de patient en contact avec différents spots contenant des CE des différents sérotypes de *Chlamydia trachomatis* sur une lame à immunofluorescence.

Une anti-globuline humaine marquée à la fluorescéine, dirigée contre l'ensemble des globulines humaines totales ou contre les IgG, les IgA ou les IgM est utilisée pour la révélation de la fixation spécifique à l'antigène.

1.2.3.3. Tests EIA sérologiques

La plupart de ces tests utilisent le LPS, antigène commun à toutes les espèces de *Chlamydia* pour la recherche et le titrage d'anticorps sériques. Ils sont par conséquent non spécifiques.

1.2.3.4. Autres tests sérologiques

Il s'agit de la détermination des cibles antigéniques des anticorps sériques par western blot et de la recherche des anticorps anti-hsp 60.

La hsp 60 est une protéine conservée et isolée de la membrane externe des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis*. Elle est capable d'induire une réponse immunitaire de type hypersensibilité retardée. L'organisme infecté développe une réponse immunitaire humorale vis à vis de cette hsp 60 [Peeling *et al.*, 1998]⁽¹⁵⁴⁾.

2. CARACTERISATION DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

En dehors de leur pouvoir pathogène, les différents types de *Chlamydia trachomatis* peuvent être identifiés par sérotypage et par génotypage.

L'identification des différents types de *Chlamydia trachomatis* possède un grand intérêt épidémiologique. Elle permet de différencier rechutes et réinfections dans le cas où des types différents seraient successivement isolés chez un même patient.

2.1. Sérotypage

L'identification des différents types de *Chlamydia trachomatis* a été initialement réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux puis monoclonaux reconnaissant des épitopes portés par la MOMP.

Une méthode d'identification, par micro-immunofluorescence, a été développée en 1973 [Wang *et al.*, 1971]⁽²¹⁶⁾.

Cette technique est basée sur la réaction entre les antigènes portés par la souche à identifier et un panel d'anticorps monoclonaux, préparés chez la souris, spécifiques de chacun des sérovars. La suspension antigénique est déposée à la plume sur une lame de verre.

La réaction, entre les antigènes de la souches et un ou plusieurs des anticorps monoclonaux, est révélée par la fixation d'un anticorps anti-immunoglobuline de souris, marqué à la fluorescéine. La lecture des résultats se fait alors au microscope à fluorescence. Cette méthode constitue aujourd'hui la technique de référence pour le typage de *Chlamydia trachomatis*. Elle reste cependant lourde car les anticorps monoclonaux ne sont toujours pas disponibles. De plus elle nécessite également une quantité importante de CE, obtenue par une étape de culture longue.

2.2. Génotypage par l'étude de *omp1*

Des méthodes de typage, basées sur l'étude du polymorphisme de restriction de *omp1* entre les différents sérovars ont été développées. Elles associent l'amplification par PCR d'un fragment du gène et l'analyse RFLP du fragment amplifié, permettant la caractérisation des différents sérovars. Plusieurs équipes ont travaillé sur cette technique [Frost *et al.*, 1991 ; Gaydos *et al.*, 1992a ; Rodriguez *et al.*, 1991 ; Sayada *et al.*, 1991]^(74, 81, 171, 179).

Cette technique permet un typage rapide des isolats cliniques, admet aisément les grandes séries, utilise un matériel et des techniques de Biologie Moléculaire courants. De plus, elle ne requiert pas de cultures préalables aussi longues que le sérotypage.

Toujours dans le cadre du typage de *Chlamydia trachomatis* par l'étude du gène *omp1*, certains auteurs ont préconisé comme méthodes beaucoup plus précises, l'électrophorèse en gel de gradient appliquée à de courtes séquences de *omp1* [Sayada *et al.*, 1992b]⁽¹⁸⁰⁾ et le séquençage de certains domaines variables de *omp1* [Dean *et al.*, 1992 ; Poole *et al.*, 1992 ; Lampe *et al.*, 1993]^(55, 160, 110).

2.3. Autres méthodes de génotypage

Des méthodes basées sur l'analyse du génome total peuvent être appliquées. Ce sont l'étude du polymorphisme de restriction du génome total [Peterson *et al.*, 1988]⁽¹⁵⁷⁾ et l'hybridation du génome total avec des sondes dérivant du gène codant pour les ARN ribosomiaux 16 S [Scieux *et al.*, 1992]⁽¹⁸⁸⁾.

L'étude du polymorphisme de restriction du génome total permet de différencier les différents biovars de *Chlamydia trachomatis* mais l'analyse des profils d'ADN total est toujours difficile à interpréter, lorsqu'ils sont réalisés avec des endonucléases à fort taux de coupure.

Actuellement la méthode génotypique de référence pour le typage des souches est la méthode d'électrophorèse en champ pulsé. L'intérêt de l'électrophorèse en champ pulsé, est l'analyse possible du génome bactérien dans son ensemble avec un petit nombre de bandes et des profils plus faciles à interpréter.

L'une de ses principales qualités est son meilleur pouvoir discriminant pour beaucoup d'espèces bactériennes, c'est à dire la forte probabilité pour que soient attribués deux types distincts à deux souches non reliées épidémiologiquement entre elles [Marty, 1997] ⁽¹²⁸⁾.

VI. SENSIBILITE DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* AUX ANTIBIOTIQUES

La méthode usuelle de détermination de la sensibilité de *Chlamydia* aux antibiotiques comporte une étape de culture de la bactérie sur lignées cellulaires en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques, suivie d'une détection au microscope des inclusions chlamydiennes colorées [Dailloux *et al.*, 1992 ; Rodriguez *et al.*, 1995] ^(52, 173).

Le niveau de sensibilité d'une souche est évalué par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

La CMI représente la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la formation de toute inclusion et la CMB est la plus faible concentration inhibant la production de corps infectieux capables de réinfecter d'autres cellules [Eb, 1995 ; Miyashita *et al.*, 1997] ^(64, 135).

Les antibiotiques considérés comme particulièrement efficaces sont ceux qui pénètrent dans les cellules et agissent sur la synthèse des protéines chlamydiennes

Les antibiotiques naturellement actifs sur *Chlamydia trachomatis* se limitent à la rifampicine, aux tétracyclines, aux macrolides et apparentés et aux fluoroquinolones [De Barbeyrac *et al.*, 1999 ; Jones *et al.*, 1990a ; Mardh *et al.*, 1989] ^(57, 101, 127). La valeurs des CMI et CMB des principales molécules actives sont rassemblées dans le tableau V page 43.

Tableau V : Valeurs et écarts des CMI et CMB des antibiotiques indiqués
sur *Chlamydia trachomatis* [Scieux *et al.*, 1990 ; Welsh *et al.*,
1992; Jones *et al.*, 1997 ; Dessus-Babus *et al.*, 1998]^(186, 223, 102, 58)

	Écarts des CMI (mg/l)	Écarts des CMB (mg/l)
Tétracyclines		
Tétracycline	0,02-0,5	0,02-4
Doxycycline	0,01-0,2	0,015-2
Minocycline	0,001-0,2	0,06-2
Macrolides vrais et apparentés		
Erythromycine	0,125-1	0,5-4
Roxithromycine	0,03-0,8	0,125
Dirithromycine	0,03-4	0,03-4
Azithromycine	0,03-1	0,5-2
Spiramycine	0,25-1	
Josamycine	0,01-1	
Clindamycine	0,25-2	
Pristinamycine	0,25-1	
Quinolones		
Ofloxacin	0,5-4	1-8
Ciprofloxacin	0,5-2	0,5-2
Sparfloxacin	0,06-0,1	0,06-0,1
Lévofloxacin	0,5-1	0,5-1
Grépafoxacin	0,06-0,1	
Trovafoxacin	0,06-0,1	
Moxifloxacin (BAY 12-8039)	0,06-0,12	0,12
Gatifloxacin (AM-1155)	0,06-0,1	0,06-0,1
Rifampicine	0,005-0,25	

DEUXIEME PARTIE
MATERIELS & METHODES

I. MATERIELS

1. TYPE D'ETUDE

Il s'agit d'une étude expérimentale multifactorielle qui a pour but de mesurer les performances des techniques de détection de *Chlamydia trachomatis* ; et de caractériser des profils génotypiques des souches de *Chlamydia trachomatis* isolées d'infections génitales basses en Côte d'Ivoire.

L'étude s'est déroulée de 1997 à 2002 et a eu pour cadre les laboratoires de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur et le laboratoire d'Histologie-Cytologie de l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences Médicales d'Abidjan.

2. PRODUITS BIOLOGIQUES

Les produits biologiques utilisés dans l'ensemble de ces travaux ont été constitués de 2311 échantillons de sécrétions génitales et de 111 échantillons de premier jet d'urines. Les échantillons de sécrétions génitales provenaient de 2031 femmes et de 280 hommes. Quant aux échantillons de premier jet d'urines, ils provenaient de 38 femmes et de 73 hommes.

Le tableau VI page 47 montre la répartition de tous ces échantillons biologiques en fonction des recherches effectuées.

Tableau VI: Répartition des échantillons biologiques en fonction des recherches effectuées

Effectif	Echantillons biologiques	Recherches effectuées
1522	Sécrétions endocervicales	Culture cellulaire
107	Sécrétions endocervicales	Coloration de Papanicolaou
100	Sécrétions endocervicales	IgA anti- <i>C. trachomatis</i>
73	Premier jet d'urines hommes	IFD
38	Premier jet d'urines hommes	
73	Sécrétions urétrales	
38	Sécrétions endocervicales	
207	Sécrétions urétrales	Amplification génique
264	Sécrétions endocervicales	

2.1. Critères d'inclusion

Tous les échantillons biologiques analysés ont été prélevés chez des hommes et des femmes en âge de procréer, venant consulter pour un diagnostic étiologique d'infections sexuellement transmissibles à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

2.2. Critères d'exclusion

Le jour du prélèvement, ont été exclues de l'étude :

- toutes les personnes sous antibiothérapie de moins deux semaines ;
- toutes les femmes en période de menstruation ou ayant eu de rapport sexuel moins de 72 heures avant ou ayant fait la toilette intime ;
- toutes les personnes ayant émis des urines moins de 4 heures de temps avant.

2.3. Qualité des échantillons biologiques et diagnostic microbiologique de la chlamydie

La bonne sensibilité des techniques de détection et notamment de la culture cellulaire de *Chlamydia* est conditionnée par la richesse en cellules des échantillons biologiques. C'est la raison qui explique l'utilisation d'écouvillons abrasifs pour les prélèvements.

Dans le cas particulier de l'isolement de *Chlamydia trachomatis* sur culture cellulaire, l'effet toxique du sang ou l'effet voilant de la glaire sur les lignées cellulaires ont été évoqués [Barnes, 1989 ; David, 1990]^(14, 53)

II. METHODES

Le présent travail a eu pour objectifs d'améliorer le diagnostic biologique de la chlamydie génitale en Côte d'Ivoire et de caractériser les souches de *Chlamydia trachomatis* responsables de l'infection.

Successivement ont été utilisées : la culture cellulaire et des méthodes alternatives telles que l'analyse des échantillons de premier jet d'urines, la coloration de Papanicolaou, la détection des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* endocervicales et l'amplification génique en vue de poser le diagnostic biologique de l'infection. Tous les amplicons de 1073 pb ont été soumis à l'action de l'endonucléase *AluI*.

1. PROTOCOLE TECHNIQUE

1.1. Culture cellulaire et méthodes alternatives de détection de *Chlamydia trachomatis*.

1.1.1. Culture cellulaire

1.1.1.1. *Traitement des échantillons*

Les échantillons de sécrétions endocervicales destinés à la culture cellulaire ont été conservés pour chacun, dans 1,5 ml de milieu 2-SP (tableau VII page 50) au congélateur à -80°C jusqu'à leur mise en culture.

Tableau VII : Composition du milieu de transport et de conservation des échantillons (2-SP) [Rodriguez *et al.*, 1991]⁽¹⁷¹⁾

Produits	Concentrations
Saccharose	0,2 M
K ₂ HPO ₄	12 mM
KH ₂ PO ₄	8 mM
Sérum de veau fœtal	10 pc
Gentamycine	10 µg/ml
Vancomycine	100 µg/ml
Fungizone	200 µg/ml

1.1.1.2. *Entretien de la lignée cellulaire Mac Coy*

Les cellules Mac Coy* ont été entretenues quotidiennement au laboratoire de Bactériologie. L'entretien des cellules Mac Coy a été réalisé en milieu de Eagle (tableau VIII page 50) dans des flacons en plastique, stériles type "Falcon".

L'incubation a été de 36,5°C sous 6,5 pc de CO₂. L'examen au microscope inversé a permis d'apprécier le degré de confluence des tapis cellulaires dans les flacons.

** Dans le cadre de cette étude, la première lignée cellulaire Mac Coy nous a été offerte gracieusement par le Professeur Jeanne Orfila du laboratoire de référence des Chlamydia à Amiens en France.*

Les cellules des tapis confluents ont été décollées sous l'action de la trypsine diluée au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium à 9 pm puis remises en suspension dans du milieu de Eagle. La suspension obtenue a été ensuite distribuée dans plusieurs flacons de culture, stériles offrant ainsi à nouveau aux cellules des espaces pour leur développement et leur multiplication.

Tableau VIII : Composition des milieux utilisés pour la culture de la lignée cellulaire Mac Coy (milieu de Eagle) et la culture de *Chlamydia trachomatis* sur celle-ci [Rodriguez *et al.*, 1991]⁽¹⁷¹⁾

Produits	Cellules Mac Coy	<i>C. trachomatis</i>
Milieu de base	MEM*	MEM
Glutamine	2 mM	2 mM
Sérum de veau fœtal	10 pc	10 pc
Gentamycine	10 µg/ml	10 µg/ml
Bicarbonate de sodium à 7.5 pc	4 pc	4 pc
Glucose à 10 pc	-	5 pc
Acides aminés non essentiels	-	1 pc
Vitamines	-	1 pc
Cycloheximide	-	1 µg/ml

*MEM : *Milieu Essentiel Minimum*

1.1.1.3. *Conservation des cellules*

L'entretien des cellules a été réalisée de manière continue sur une longue période (deux mois environ). Il a permis de disposer de cellules en quantité puis d'en faire des réserves. La conservation a été réalisée sous forme d'aliquots en cryotubes à -80°C au congélateur.

Le milieu de conservation des cellules contient du diméthyl-sulfoxyde (DMSO) dont le rôle essentiel est de ralentir le métabolisme des cellules, les mettant ainsi dans un état quiescent.

Pour les réutiliser, le contenu des cryotubes a été décongelé à la température du 22°C pendant 10 minutes puis centrifugé 15 minutes à 3000 tours par minute. Le surnageant riche en DMSO a été rejeté et le culot cellulaire remis dans 15 ml de milieu de Eagle.

1.1.1.4. *Isolement de *Chlamydia trachomatis* à partir des échantillons biologiques*

a) Tapis cellulaire

L'isolement de *Chlamydia trachomatis* a été effectué dans les puits de plaques stériles en "Luxlon" (figure 4 page 52). Chaque puits contient une lamelle ronde stérile de 12 mm de diamètre sur laquelle se développe le tapis cellulaire. La lamelle a étéensemencée avec un inoculum cellulaire à 10^5 cellules par ml, permettant l'obtention d'un tapis cellulaire confluent monocouche en 24 heures d'incubation à $36,5^{\circ}\text{C}$ sous 6,5 pc de CO_2 .

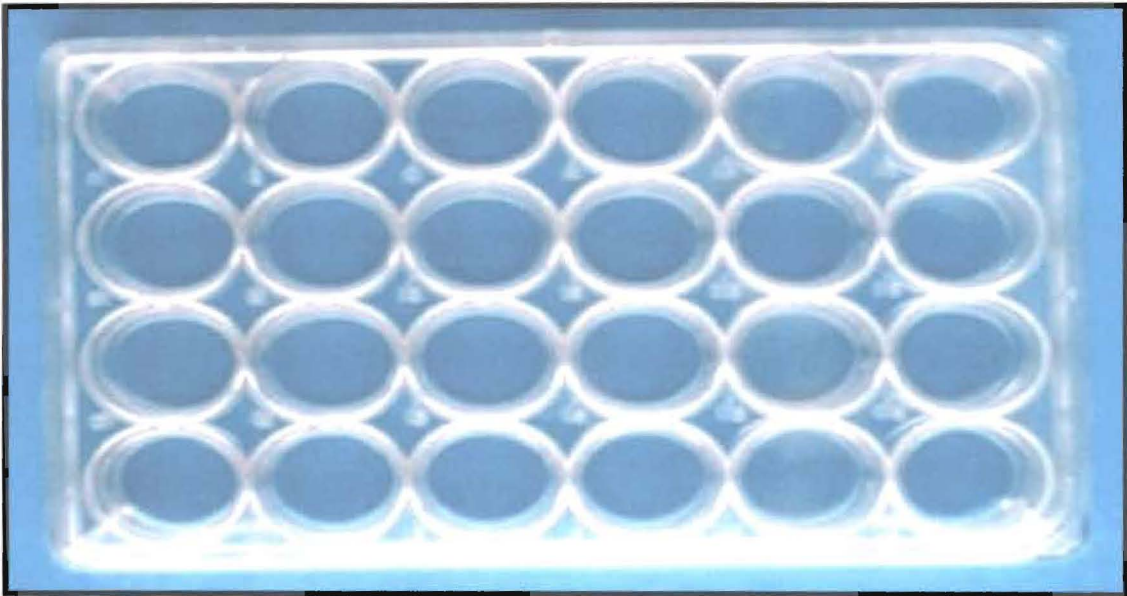


Figure 4 : Plaque en « Luxlon » de 24 puits pour culture cellulaire

b) Inoculation des échantillons biologiques

Les échantillons biologiques en milieu de conservation au congélateur à -80°C , ont été sortis et décongelés par exposition pendant 10 minutes à la température du laboratoire (22°C). Chaque échantillon biologique a été agité vigoureusement au vortex pendant 1 minute, en présence de 10 billes de verre stériles de 2 mm de diamètre, afin d'obtenir une suspension homogène et de libérer les corps élémentaires bactériens.

Chaque échantillon biologique a été inoculé dans trois puits de la plaque à raison de 300 μl d'échantillon par puits, après élimination du milieu nutritif cellulaire. Les plaquesensemencées ont été centrifugées à la température de $36,5^{\circ}\text{C}$ dans une centrifugeuse réfrigérée à rotor à plaques, 1 heure à 2500 tours par minute ; puis incubées 2 heures à $36,5^{\circ}\text{C}$ sous 6,5 pc de CO_2 afin de faciliter le contact des corps élémentaires avec les cellules et de leur permettre de pénétrer dans le cytoplasme cellulaire. L'inoculum a été ensuite rejeté et remplacé par du milieu de Eagle supplémenté en acides aminés non essentiels, en vitamines, en glucose et contenant de la cycloheximide qui va bloquer la synthèse protéique des cellules et favoriser la multiplication de *Chlamydia trachomatis*. Les plaques ont été enfin incubées à $36,5^{\circ}\text{C}$ en atmosphère enrichie de 6,5 pc de CO_2 pendant 48 heures, temps nécessaire au développement de *Chlamydia trachomatis*.

c) Révélation de l'effet cytopathique (ECP)

L'ECP de *Chlamydia trachomatis* se traduit par la présence d'inclusions dans les cellules.

La révélation des inclusions chlamydiennes a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de l'espèce *Chlamydia trachomatis* (Microtrak Syva).

Le tapis cellulaire a été fixé 10 minutes avec du méthanol absolu, après élimination du milieu de culture.

La solution d'anticorps monoclonal a été déposée sur le tapis cellulaire et laissée au contact pendant 30 minutes à 37°C sous atmosphère normale et humide. Les inclusions, ayant fixé l'anticorps marqué à la fluorescéine, ont été détectées par observation au microscope à fluorescence (Leitz/Biomed) à l'objectif X40.

1.1.1.5. *Conservation des isolats de Chlamydia trachomatis*

Les isolats des cultures positives ont été recueillis par grattage des tapis cellulaires correspondants après élimination du milieu de Eagle.

La conservation des isolats a été réalisée à -80°C en milieu 4-SP (0,4M saccharose, 15 mM Na₂HPO₄) contenant 10 pc de sérum de veau fœtal.

1.1.2. Détection de *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de premier jet d'urines

1.1.2.1. *Traitement des échantillons biologiques*

Les écouvillons ayant servi à la réalisation des prélèvements des échantillons de sécrétions génitales ont été exprimés chacun dans 1 ml de PBS.

Un volume de 10 ml de premier jet d'urines a été recueilli pour chaque patient dans un tube conique stérile.

L'ordre des prélèvements n'a pas été randomisé. Le prélèvement des sécrétions génitales a toujours précédé le prélèvement du premier jet d'urines.

Les échantillons de sécrétions génitales en PBS et des urines ont été centrifugés à 3000 tours par minute pendant 10 minutes.

1.1.2.2. Recherche des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis*

La recherche des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* a été réalisée sur les culots de centrifugation des échantillons de sécrétions génitales et de premier jet d'urines. Une goutte de culot a été déposée, séchée et fixée à l'acétone glaciale dans le puits (5mm de diamètre) d'une lame de verre. Elle a été ensuite recouverte d'une goutte d'anticorps monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* (pathfinder *Chlamydia trachomatis* du laboratoire Kallestad Diagnostics) et incubée 15 minutes à la température ambiante en chambre humide. Elle a été enfin recouverte d'une lamelle ronde de 8 mm de diamètre après dépôt d'une goutte de fluoprep. L'observation a été réalisée au microscope à fluorescence (Leitz / Biomed) à l'objectif X40.

Le nombre de corps élémentaires mis en évidence, a été utilisé pour classifier les échantillons afin de juger de leur richesse en antigène chlamydien. Deux groupes d'échantillons ont été constitués par rapport à cette classification. Ceux qui contenaient moins de 10 corps élémentaires par champ et ceux qui en contenaient plus de 10.

1.1.3. Détection de *Chlamydia trachomatis* par la coloration de Papanicolaou

1.1.3.1. Traitement des échantillons

Les prélèvements des échantillons de sécrétions endocervicales ont été réalisés à l'aide de spatules d'Ayre pour confectionner des frottis.

1.1.3.2. Recherche d'anomalies évocatrices d'infection à *Chlamydia trachomatis* par la Coloration de Papanicolaou

Après fixation à l'acétone, les frottis confectionnés ont été plongés dans des bains successifs de réactifs comme indiqué dans le tableau IX.

Tableau IX : Différents bains utilisés pour la réalisation de la coloration de Papanicolaou

N°d'ordre des bains	Bains	Durée	Rôle
1	Alcool à 80°	30 sec.	Hydratation
2	Alcool à 90°	30 sec.	
3	Alcool à 50°	30 sec.	
4	Eau distillée	30 sec.	
5	Hématoxyline	3 à 6 mn	Coloration
6	Eau distillée	10 plongeon	Nucléaire
7	Acide chlorhydrique	1 plongeon	Décoloration
8	Eau courante	6 mn	
9	Alcool à 50°	30 sec.	Déshydratation
10	Alcool à 70°	30 sec.	
11	Alcool à 80°	30 sec.	
12	Alcool à 95°	30 sec.	
13	Orange « G »	90 sec.	Coloration
14	Alcool à 95°	10 plongeon	
15	Mélange polychrome	90 sec.	
16	Alcool à 95°	10 plongeon	Préparation à l'embaumement
17	Alcool absolu	30 sec.	
18	Toluène	30 sec.	

Les frottis ainsi colorés, ont été recouverts chacun d'une lamelle 20 mm X 20 mm après dépôt de deux gouttes de baume de Canada.

Ils ont été ensuite observés au microscope optique X40. Toutes les anomalies cytologiques évocatrices d'infections à *Chlamydia trachomatis* ont été recherchées.

1.1.3.3. Recherche des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis*

Les corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* ont été recherchés par immunofluorescence directe, avec l'anticorps monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* (pathfinder *Chlamydia trachomatis* du laboratoire Kallestad Diagnostics) au microscope à fluorescence (Leitz Biomed) à l'objectif X40.

1.1.4. Détection des immunoglobulines anti-*Chlamydia trachomatis*

1.1.4.1. Traitement des échantillons

Les échantillons de sécrétions endocervicales ont été prélevés au moyen d'écouvillons abrasifs. Les écouvillons ont été ensuite exprimés, dans 1 ml de PBS chacun. Les suspensions obtenues ont été centrifugées à 3000 tours par minute pendant 15 minutes puis les culots et les surnageants séparés.

1.1.4.2. Recherche des immunoglobulines totales et des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis*

La recherche des immunoglobulines anti-*Chlamydia trachomatis* a été effectuée sur les surnageants des échantillons biologiques par la technique de *Chlamydia*-Spot IF-Kit du laboratoire Biomérieux.

Un volume de 20 µl de surnageant a été déposé sur le spot indiqué. L'incubation a été de 30 minutes à 37 °C en chambre humide. Après lavage en PBS, le conjugué a été ajouté et l'incubation renouvelée. Après un second lavage, le spot a été recouvert d'une goutte de fluoprep, puis d'une lamelle ronde de 8 mm de diamètre. L'observation a été réalisée au microscope à fluorescence (Leitz/Biomed) à l'objectif X40.

1.1.4.3. Recherche de l'antigène chlamydien

L'antigène chlamydien a été recherché comme précédemment en immunofluorescence, sur les culots de centrifugation des échantillons de sécrétions endocervicales en PBS avec l'anticorps monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* (pathfinder *Chlamydia trachomatis* du laboratoire Kallestad Diagnostics).

1.1.5. Détection de *Chlamydia trachomatis* par amplification génique

1.1.5.1. Principe

Le gène *omp1*, codant pour la protéine majeure de la membrane externe, est constitué de quatre domaines variables (DV) encadrés par cinq domaines constants (DC).

L'utilisation de deux amorces oligonucléotidiques CTU et CTL dont les séquences sont indiquées dans le tableau X page 59 [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾, situés respectivement dans les domaines DC1 et DC5, permet l'amplification d'un fragment de 1073 pb chez toutes les souches de *Chlamydia trachomatis*.

Tableau X : Séquences nucléotidiques des amorces CTU et CTL [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾

CTU : 5'-ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG-3'

CTL : 5'-CAAGATTTTCTAGA(T/C)TTGTT-3'

1.1.5.2. *Traitement des échantillons biologiques*

L'échantillon biologique destiné à l'amplification génique a été agité vigoureusement au vortex pendant 1 minute en présence de 10 billes de verre stériles de 2 mm de diamètre pour faire éclater les cellules épithéliales et libérer les particules infectieuses.

Un volume de 100 µl a été alors prélevé et complété à 1000 µl avec du PBS stérile puis centrifugé à 13000 tours par minute pendant 90 minutes à +4°C dans une centrifugeuse Eppendorf réfrigérée. Le surnageant a été éliminé et le culot mis en suspension dans 150 µl d'un tampon de lyse contenant : 10 mM de Tris-HCl à pH 8 ; 50 mM de KCl ; 2,5 mM de MgCl₂ ; 0,5 pc de Nonidet P-40 ; 0,5 pc de Tween 20 et 60 µg/ml de protéinase K. La suspension a été incubée à 60°C pendant 90 minutes. Après la lyse, une extraction par le mélange phénol /chloroforme (v/v) suivie d'une précipitation des acides nucléiques à l'éthanol absolu a été réalisée. Les acides nucléiques ont été ensuite lavés à l'éthanol à 70 pc puis mis en suspension dans 50 µl d'eau stérile.

Un des isolats de cultures positives obtenus au cours de la culture cellulaire a servi de contrôle positif tandis qu'un tube contenant que de l'eau distillée stérile a été utilisé comme contrôle pour mettre en évidence l'absence de contamination au cours des étapes de traitement des échantillons biologiques.

1.1.5.3. Conditions de l'amplification génique

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 μ l. Le mélange réactionnel exempt d'ADN matriciel, a été préparé et distribué à raison de 40 μ l dans les tubes Eppendorf de 0,2 ml, dans une pièce au sein de laquelle aucune préparation d'ADN chlamydien n'a été jamais introduite. La composition du mélange réactionnel a été la suivante : 10 mM de Tris-HCl à pH 8,3 ; 50 mM de KCl ; 2,5 mM de $MgCl_2$; 200 μ M de chaque déoxyribonucléotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 pM de chaque amorce et 1 Unité de Taq ADN Polymerase (Perkin Elmer).

Les échantillons d'acides nucléiques à tester ont été distribués sous une hotte à flux laminaire de type I à raison de 10 μ l d'échantillon lysé par tube.

Les tubes ainsi préparés ont été placés dans un Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus 9700). La réaction de PCR a été composée :

- d'une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C
- d'une étape cyclique répétée 30 fois dans les conditions suivantes :
 - une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes,
 - une fixation des amorces à 50°C pendant 30 secondes,
 - une élongation à 72°C pendant 2 minutes.
- d'une étape d'élongation terminale de 7 minutes à 72°C.

1.1.5.4. *Mise en évidence des produits d'amplification*

L'analyse des produits d'amplification a été réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 pc contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET), sur 10 µl d'amplicon. L'ADN a été migré 90 minutes sous 80 Volts en tampon TBE 1X (Tris 90 mM, Acide borique 90 mM, EDTA 2 mM pH 8) et visualisé sur un transilluminateur UV à une longueur d'onde de $\lambda = 312$ nm. Une photo du gel a été réalisée à l'aide d'un système photographique polaroid MP 4+.

1.2. Caractérisation des profils génomiques de *Chlamydia trachomatis* par la technique du polymorphisme des fragments de restriction

1.2.1. Principe

Le fragment CTU/CTL amplifié et soumis à l'action de l'endonucléase *AluI*, génère des fragments de taille variable.

L'analyse des profils de restriction obtenus sur gel de polyacrylamide permet de reconnaître au moins 14 sérovars majeurs des 18 identifiés jusqu'à présent [Rodriguez *et al.*, 1991]⁽¹⁷¹⁾.

1.2.2. Traitement des amplicons

Les amplicons destinés à la digestion enzymatique ont été traités avec du chloroforme pur, à raison de quatre volumes de chloroforme pour un volume de produit amplifié. Après homogénéisation et centrifugation à 13000 tours par minute pendant 3 minutes à +4°C dans une centrifugeuse Eppendorf réfrigérée , la phase aqueuse contenant l'ADN a été prélevée et additionnée de 1 ml d'éthanol absolu.

Le mélange a été incubé 30 minutes à -80°C au congélateur puis centrifugé à 13000 tours par minute pendant 20 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$ dans une centrifugeuse Eppendorf réfrigérée. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 1 ml d'éthanol à 70° sortant du congélateur à -20°C . Le nouveau mélange a été centrifugé à 13000 tours par minute pendant 5 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$ puis le surnageant rejeté. Le culot obtenu a été séché pendant 15 minutes dans un bloc chauffant à 56°C et mis en suspension dans $50\ \mu\text{l}$ d'eau distillée stérile.

1.2.3. Digestion par *AluI*

La réaction de digestion a été réalisée dans un volume final de $20\ \mu\text{l}$ contenant 8 unités d'*AluI* (Roche), le tampon approprié (3,3 mM Tris-acétate, 6,6 mM Acétate de potassium, 1 mM Acétate de magnésium et 0,05 mM dithiothréol, pH 7,9) et $5\ \mu\text{l}$ d'ADN amplifié.

Le mélange réactionnel a été incubé pendant 4 heures de temps dans un bain-marie à 37°C .

1.2.4. Mise en évidence des produits d'hydrolyse

La révélation a été faite par migration de tout le volume réactionnel, alourdi avec du bleu de charge, sur un gel d'agarose à 2,5 pc contenant du TAE (Tris 40 mM ; Acide acétique glacial 33 mM ; EDTA 2 mM), du bromure d'éthidium (BET) à $0,5\ \mu\text{g/ml}$ et en présence du marqueur de poids moléculaire SmartLadder (Eurogentec) dont les tailles des fragments sont : 10000 pb, 8000 pb, 6000 pb, 5000 pb, 4000 pb, 3000 pb, 2500 pb, 2000 pb, 1500 pb, 1000 pb, 800 pb, 600 pb, 400 pb et 200 pb.

Après migration, le gel a été visualisé sur une plaque UV à une longueur d'onde de $\lambda = 312$ nm. Une photo du gel a été réalisée à l'aide d'un système photographique polaroid MP 4+.

1.2.5. Détermination des différents génotypes

La détermination des différents génotypes s'est faite par comparaison des profils de restriction obtenus avec ceux de Sayada [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾, après hydrolyse par *AluI* (Roche) des souches de référence (tableau XI page 64).

2. ANALYSE STATISTIQUE

Au plan statistique, au seuil $\alpha = 5$ pc les variables qualitatives ont été décrites par leur écart à la médiane. Les variables quantitatives ont été comparées à l'aide d'une analyse de variance ou par le Khi^2 de contingence à plusieurs degrés de liberté.

Les mesures d'association ont été estimées par le rapport de cote. Les performances des tests ont été estimées par la mesure de la sensibilité et de la spécificité des dits tests. Pour les variables dont les effectifs théoriques marginaux sont inférieurs à 5, le tests de Fisher a été utilisé.

Tableau XI : Différents fragments obtenus après hydrolyse par *AluI* des produits d'amplification des souches de référence [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾.

Génotypes	Fragments (pb)
L2	227, 225, 132, 102, 96
L2a	227, 225, 132, 102, 96
L1	241, 228, 204,
E	241, 225, 132, 102, 96
D	241, 225, 195
Da	241, 225, 195
Ba	244, 204, 195, 91
B	244, 225, 195, 91
F	321, 256, 207, 101, 80
G	321, 207, 195, 107, 96, 80
C	442, 305, 138
J	435, 305, 138,
A	486, 302, 138
K	486, 213, 138, 92
H	458, 305, 138,
I	458, 302, 138,
Ia	458, 302, 138
L3	458, 305, 138

TROISIEME PARTIE
RESULTATS & DISCUSSION



CHAPITRE I
RESULTATS

Les résultats ont été répartis comme suit :

- les résultats obtenus par l'utilisation de la culture cellulaire pour détecter *Chlamydia trachomatis* ;
- les résultats obtenus au moyen des méthodes non normalisées de détection de *Chlamydia trachomatis* ;
- les résultats de la caractérisation des souches de *Chlamydia trachomatis* ;

I. RESULTATS DES CULTURES CELLULAIRES

Sur la base de l'observation au microscope à fluorescence, trois types de résultats ont été dégagés :

- résultats négatifs : tous les tapis cellulaires rouge-vif présentant des cellules à contours bien nets et sans inclusions vert-pomme (figure 5 page 68);
- résultats positifs : tous les tapis cellulaires présentant d'inclusions vert- pomme intracellulaires sur un fond rouge-vif (figure 6 page 68);
- résultats non interprétables : tous les tapis cellulaires voilés par de la glaire ou présentant des cellules de couleur rouge-sombre à contours mal délimités, signe de la non viabilité des cellules ; ou toute absence de tapis cellulaires se traduisant par un fond microscopique coloré au bleu.



Figure 5 : Résultat négatif (tapis cellulaire sans inclusions cytoplasmiques). Grossissement X 400.

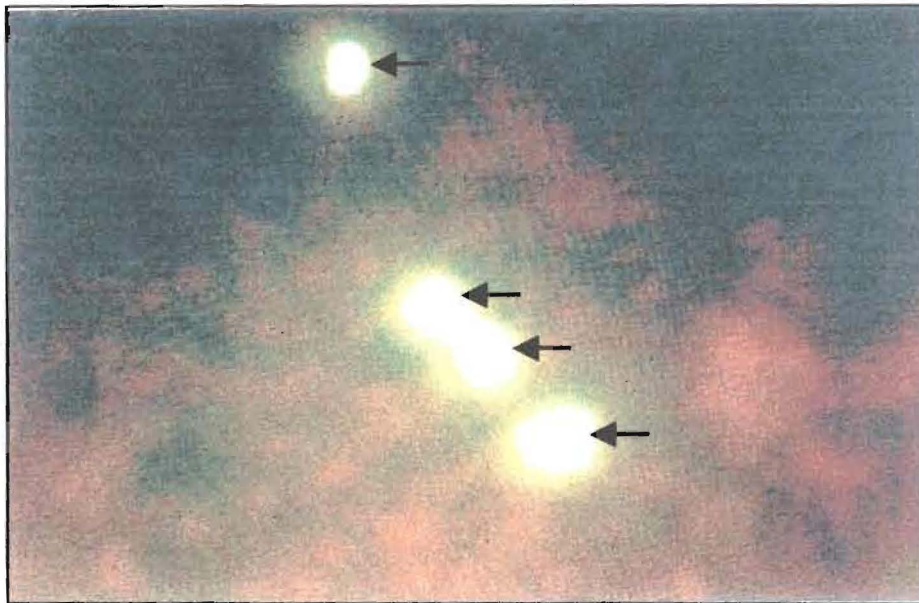


Figure 6 : Résultat positif (présence d'inclusions cytoplasmiques fluorescentes « vert pomme »). Grossissement X 400.

Le mélange a été incubé 30 minutes à -80°C au congélateur puis centrifugé à 13000 tours par minute pendant 20 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$ dans une centrifugeuse Eppendorf réfrigérée. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 1 ml d'éthanol à 70° sortant du congélateur à -20°C . Le nouveau mélange a été centrifugé à 13000 tours par minute pendant 5 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$ puis le surnageant rejeté. Le culot obtenu a été séché pendant 15 minutes dans un bloc chauffant à 56°C et mis en suspension dans 50 μl d'eau distillée stérile.

1.2.3. Digestion par *AluI*

La réaction de digestion a été réalisée dans un volume final de 20 μl contenant 8 unités d'*AluI* (Roche), le tampon approprié (3,3 mM Tris-acétate, 6,6 mM Acétate de potassium, 1 mM Acétate de magnésium et 0,05 mM dithiothréol, pH 7,9) et 5 μl d'ADN amplifié.

Le mélange réactionnel a été incubé pendant 4 heures de temps dans un bain-marie à 37°C .

1.2.4. Mise en évidence des produits d'hydrolyse

La révélation a été faite par migration de tout le volume réactionnel, alourdi avec du bleu de charge, sur un gel d'agarose à 2,5 pc contenant du TAE (Tris 40 mM ; Acide acétique glacial 33 mM ; EDTA 2 mM), du bromure d'éthidium (BET) à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ et en présence du marqueur de poids moléculaire SmartLadder (Eurogentec) dont les tailles des fragments sont : 10000 pb, 8000 pb, 6000 pb, 5000 pb, 4000 pb, 3000 pb, 2500 pb, 2000 pb, 1500 pb, 1000 pb, 800 pb, 600 pb, 400 pb et 200 pb.

Après migration, le gel a été visualisé sur une plaque UV à une longueur d'onde de $\lambda = 312$ nm. Une photo du gel a été réalisée à l'aide d'un système photographique polaroid MP 4+.

1.2.5. Détermination des différents génotypes

La détermination des différents génotypes s'est faite par comparaison des profils de restriction obtenus avec ceux de Sayada [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾, après hydrolyse par *AluI* (Roche) des souches de référence (tableau XI page 64).

2. ANALYSE STATISTIQUE

Au plan statistique, au seuil $\alpha = 5$ pc les variables qualitatives ont été décrites par leur écart à la médiane. Les variables quantitatives ont été comparées à l'aide d'une analyse de variance ou par le Khi^2 de contingence à plusieurs degrés de liberté.

Les mesures d'association ont été estimées par le rapport de cote. Les performances des tests ont été estimées par la mesure de la sensibilité et de la spécificité des dits tests. Pour les variables dont les effectifs théoriques marginaux sont inférieurs à 5, le tests de Fisher a été utilisé.

Tableau XI : Différents fragments obtenus après hydrolyse par *AluI* des produits d'amplification des souches de référence [Sayada *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁹⁾.

Génotypes	Fragments (pb)
L2	227, 225, 132, 102, 96
L2a	227, 225, 132, 102, 96
L1	241, 228, 204,
E	241, 225, 132, 102, 96
D	241, 225, 195
Da	241, 225, 195
Ba	244, 204, 195, 91
B	244, 225, 195, 91
F	321, 256, 207, 101, 80
G	321, 207, 195, 107, 96, 80
C	442, 305, 138
J	435, 305, 138,
A	486, 302, 138
K	486, 213, 138, 92
H	458, 305, 138,
I	458, 302, 138,
Ia	458, 302, 138
L3	458, 305, 138

TROISIEME PARTIE
RESULTATS & DISCUSSION



CHAPITRE I
RESULTATS

Les résultats ont été répartis comme suit :

- les résultats obtenus par l'utilisation de la culture cellulaire pour détecter *Chlamydia trachomatis* ;
- les résultats obtenus au moyen des méthodes non normalisées de détection de *Chlamydia trachomatis* ;
- les résultats de la caractérisation des souches de *Chlamydia trachomatis* ;

I. RESULTATS DES CULTURES CELLULAIRES

Sur la base de l'observation au microscope à fluorescence, trois types de résultats ont été dégagés :

- résultats négatifs : tous les tapis cellulaires rouge-vif présentant des cellules à contours bien nets et sans inclusions vert-pomme (figure 5 page 68);
- résultats positifs : tous les tapis cellulaires présentant d'inclusions vert- pomme intracellulaires sur un fond rouge-vif (figure 6 page 68);
- résultats non interprétables : tous les tapis cellulaires voilés par de la glaire ou présentant des cellules de couleur rouge-sombre à contours mal délimités, signe de la non viabilité des cellules ; ou toute absence de tapis cellulaires se traduisant par un fond microscopique coloré au bleu.

1. CULTURE CELLULAIRE ET ASPECT MACROSCOPIQUE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Selon l'aspect macroscopique, deux types d'échantillons ont été observés. Ce sont les échantillons ayant un aspect macroscopique sans particularité et les échantillons contenant du sang ou de la glaire (tableau XII).

Tableau XII : Répartition des échantillons biologiques selon l'aspect macroscopique et le résultat de la culture cellulaire

	Cultures cellulaires (nb = 1522)	
	Interprétables (nb = 1316)	Ininterprétables (nb = 206)
Echantillons sans particularité (nb = 1191)	1149 (87,3 pc)	42 (20,4 pc)
Echantillons avec sang ou glaire (nb = 331)	167 (12,7 pc)	164 (79,6 pc)
• avec du sang (nb = 294)	148	146
• avec de la glaire (nb = 37)	19	18

▪ $Khi^2 = 468,7$

$ddl = 1$

$p = 10^{-7}$ (Différence significative)

Les échantillons à aspect macroscopique sans particularité ont représenté 78,3 pc (1191/1522) des cas et les échantillons contenant du sang ou de la glaire 21,7 pc (331/1522). Malgré l'aspect de ces derniers, ils ont tous fait l'objet d'une culture afin de déterminer l'influence du sang et de la glaire sur la lignée cellulaire Mac Coy.

La proportion des cultures cellulaires dont les résultats n'ont pas pu être interprétés a été de 13,5 pc (206/1522).

Par rapport à l'interprétation des résultats des cultures cellulaires, une différence significative a été notée entre les échantillons de sécrétions endocervicales sans particularité et ceux qui contenaient du sang ou de la glaire.

2. CAUSES DE LA NON INTERPRETATION DES RESULTATS DE LA CULTURE

Parmi les 1522 échantillons qui ont été passés en culture sur lignée cellulaire, les résultats de 206 (13,5 pc) n'ont pu faire l'objet d'une interprétation fiable. Ils ont été constitués de 20,4 pc (42/206) d'échantillons dont l'aspect macroscopique était sans particularité et de 79,6 pc (164/206) d'échantillons qui contenaient du sang ou de la glaire (tableau XIII page 71).

Tableau XIII : Répartition des causes de la non interprétation des résultats de la culture des échantillons.

Echantillons (nb = 206)	Cause de non interprétation	
	Absence de tapis cellulaire	Absence de cellules viables
Sans particularité (nb = 42)	23 (29,9 pc)	19 (14,7 pc)
Avec sang ou glaire (nb = 164)	54 (70,1 pc)	110 (85,3 pc)
. avec du sang (nb = 146)	52	94
. avec de la glaire (nb = 18)	2	16
Total	77	129

▪ $Kh^2 = 6,81$ $ddl = 1$ $p = 0,009$ (Différence significative)

Les résultats de la culture de ces échantillons n'ont pu être interprétés, pour des raisons d'absence de tapis cellulaire ou de cellules vivantes. Les causes de la non interprétation des résultats des cultures cellulaires ont été liées à l'aspect des échantillons biologiques. La présence de sang ou de la glaire dans ces échantillons a augmenté le taux de cellules non vivantes

3. INFLUENCE DU SANG ET DE LA GLAIRE SUR LA POSITIVITE DES ECHANTILLONS AYANT DONNE A LA CULTURE DES RESULTATS INTERPRETABLES

Après passage en culture sur lignée cellulaire, 1316 échantillons ont montré des cultures dont les résultats ont pu être interprétés. Ils ont été constitués de 87,3 pc (1149/1316) d'échantillons sans particularité à l'examen macroscopique et de 12,7 pc (167/1316) d'échantillons contenant du sang ou de la glaire (tableau XIV).

Tableau XIV : Répartition des échantillons biologiques ayant donné à la culture des résultats interprétables

	Cultures interprétables (nb = 1316)	
	Positives (nb = 143)	négatives (nb = 1173)
Echantillons sans particularité (nb = 1149)	126 (88,1 pc)	1023 (87,3 pc)
Echantillons avec sang ou glaire (nb = 167)	17 (11,9 pc)	150 (12,7 pc)
• avec du sang (nb = 148)	12	136
• avec de la glaire (nb = 19)	5	14

▪ $Khi^2 = 0,09$

$ddl = 1$

$p = 0,76$ (Différence non significative)

Le taux de succès de la culture cellulaire a été évalué à 86,5 pc (1316/1522).

Parmi les 1316 échantillons, 143 ont donné des cultures positives qui se sont traduites par la présence des inclusions cytoplasmiques. Le taux de positivité de l'infection par *Chlamydia trachomatis* a été alors estimé à 10,8 pc. Ce taux de l'infection chlamydienne a été évalué à 10,9 pc (126/1149) pour les échantillons qui avaient un aspect macroscopique sans particularité ; il a été de 8,1 pc (12/148) pour les échantillons qui contenaient du sang et de 26,3 pc (5/19) pour les échantillons qui contenaient de la glaire.

Au plan statistique, il n'y a pas eu de différence significative entre le taux de positivité des échantillons dont l'aspect macroscopique était sans particularité et celui des échantillons qui contenaient du sang.

4. TAILLE DES INCLUSIONS OBSERVEES ET ASPECT MACROSCOPIQUE DES ECHANTILLONS POSITIFS

Par rapport à la taille, 3 catégories d'inclusions cytoplasmiques ont été notées (tableau XV page 74). Il s'agit d'inclusions cytoplasmiques de grande taille (500 μm de diamètre), d'inclusions cytoplasmiques de taille moyenne (250 μm de diamètre) et d'inclusions cytoplasmiques de petite taille (100 μm de diamètre).

Tableau XV : Répartition des inclusions en fonction de leur taille et de leur nombre d'unités formant inclusion (UFI) par ml.

Taille des inclusions (nb = 143)	Nombre UFI/ml			
	100		> 100	
	nb	pc	nb	pc
500µm de diamètre (nb = 40)	25	(17,5 pc)	15	(10,5 pc)
250µm de diamètre (nb = 32)	22	(15,4 pc)	10	(7 pc)
100µm de diamètre (nb = 71)	40	(28 pc)	31	(21,7 pc)
Total	87	(60,9 pc)	56	(39,2 pc)

▪ $Khi^2 = 1,49$ $ddl = 2$ $p = 0,47$ (Différence non significative)

Le nombre d'inclusions cytoplasmiques de petite taille a été élevé (71/143) comparé aux nombres d'inclusions de grande (40/143) et de moyenne (32/143) tailles. Parmi les inclusions de grande taille, 37,5 pc (15/40) ont eu plus de 100 UFI/ml contre 32,2 pc (10/31) pour les inclusions de taille moyenne et 43,6 pc (31/71) pour les inclusions de petite taille.

La plupart des échantillons déclarés positifs après culture cellulaire (60,8 pc), ont montré des inclusions cytoplasmiques de moins de 100 UFI/ml (tableau XVI).

Tableau XVI : Répartition des inclusions en fonction de l'aspect macroscopique des échantillons positifs

Echantillons positifs (nb = 143)	Nombre UFI/ml			
	100		> 100	
	nb	pc	nb	pc
Sans particularité (nb = 126)	76	(60,3 pc)	50	(39,7 pc)
Avec sang ou glaire (nb = 17)	11	(64,7 pc)	6	(35,3 pc)
Total	87	(60,8 pc)	56	(39,2 pc)

▪ $Kh^2 = 0,12$ $ddl = 1$ $p = 0,72$ (Différence non significative)

Les inclusions cytoplasmiques de moins de 100 UFI/ml, ont signé la positivité des échantillons sans particularité dans 60,3 pc des cas (76/126) contre 64,7 pc (11/17) pour les échantillons qui contenaient du sang ou de la glaire. La différence n'a pas été statistiquement significative. La présence de sang ou de la glaire n'a pas influé sur le nombre d'unités formant inclusion (UFI) des inclusions.

II. UTILISATION DES METHODES NON NORMALISEES

1. ECHANTILLONS DE PREMIER JET D'URINES

A l'immunofluorescence directe, les corps élémentaires se sont présentés sur les frottis comme de petits points réticulés de couleur vert-pomme. Tous les frottis ayant montré 5 corps élémentaires au moins par champ d'observation, ont été déclarés positifs (figure 7 page 77).

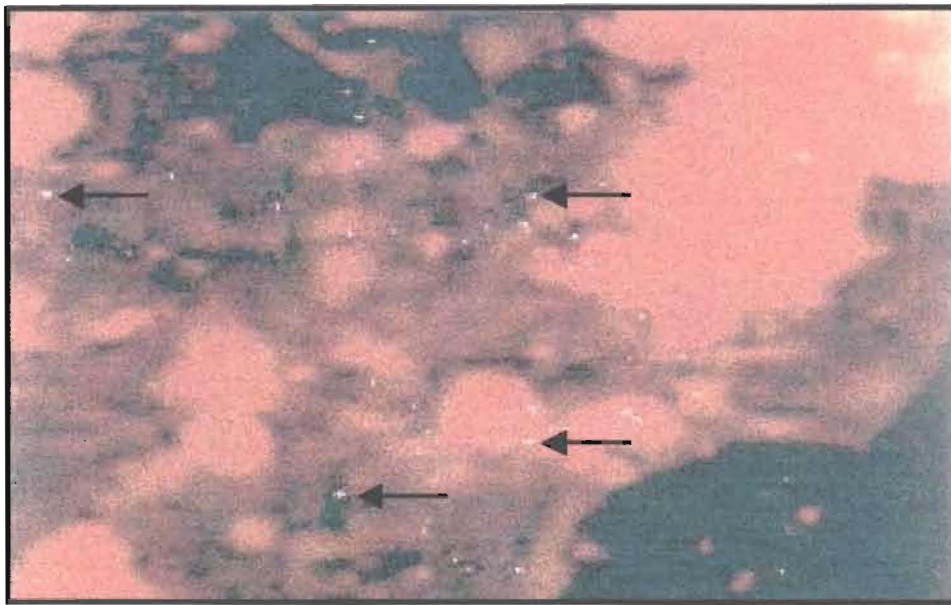


Figure 7 : Résultat positif (présence d'au moins 5 CE à l'immunofluorescence directe). Grossissement X 400.

1.1. Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines

Sur l'ensemble de la population d'étude, l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines a présenté une bonne spécificité par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales (tableau XVII).

Tableau XVII : Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales

Echantillons	Sécrétions génitales				
	Positif	Négatif	Se	Sp	
Puj	Positif	19	0	73,1 pc	100 pc
	Négatif	7	90		
Total		26	90		

▪ *Pju* = Premier jet d'urines

Se = Sensibilité

Sp = Spécificité

Chez l'homme, l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport aux échantillons de sécrétions génitales, a montré une sensibilité et une spécificité de 100 pc (tableau XVIII page 79).

Tableau XVIII : Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales chez les hommes.

Echantillons	Sécrétions génitales			
	Positif	Négatif	Se	Sp
Pju	Positif	16	0	100 pc
	Négatif	0	62	
Total		16	62	

▪ *Pju = Premiers jets d'urines*

Se = Sensibilité

Sp = Spécificité

Chez la femme si la spécificité a été évaluée à 100 pc, la sensibilité par contre a été basse (tableau XIX page 80).

Tableau XIX : Performances de l'utilisation des échantillons de premier jet d'urines par rapport à l'utilisation des échantillons de sécrétions génitales chez les femmes.

Echantillons	Sécrétions génitales			
	Positif	Négatif	Se	Sp
Pju	Positif	3	0	30 pc 100 pc
	Négatif	7	28	
Total		10	28	

▪ Pju = Premiers jets d'urines

Se = Sensibilité

Sp = Spécificité

1.2. Richesse en corps élémentaires et échantillons biologiques

Les différents échantillons biologiques ont été regroupés suivant leur richesse en corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* (tableau XX page 81).

Tableau XX : Répartition des échantillons en fonction de la richesse en corps élémentaires

Présence de <i>Chlamydia trachomatis</i>			
	Sécrétions génitales	Premier jet d'urine	p
Hommes nb = 6			
<10 CE	10 (62,5 pc)	9 (56,3 pc)	
>10 CE	6 (37,5 pc)	7 (43,7 pc)	0,89
Femmes nb = 10			
<10 CE	8 (80 pc)	5 (71,4 pc)	
>10 CE	2 (20 pc)	2 (28,6 pc)	0,13

▪ *CE = Corps Élémentaire*

Chez l'homme, 62,5 pc des échantillons de sécrétions génitales et 56,3 pc des échantillons de premier jet d'urines ont montré moins de 10 corps élémentaires par champ. Concernant le groupe des échantillons ayant plus de 10 corps élémentaires par champ, les échantillons de premier jet d'urines ont semblé plus riches en bactéries que les échantillons de sécrétions génitales ; cependant la différence observée n'a pas été statistiquement significative.

Chez les femmes, 80 pc des échantillons de sécrétions génitales et 71,4 pc des échantillons de premier jet d'urines ont contenu moins de 10 corps élémentaires par champ.

Ici également la différence observée entre les deux types d'échantillons n'a pas été statistiquement significative lorsque le nombre de corps élémentaires a été supérieur à 10 par champ microscopique.

Par ailleurs le nombre moyen de corps élémentaires observés par champ microscopique a été recherché aussi bien dans les échantillons de sécrétions génitales que dans les échantillons de premier jet d'urines. Chez l'homme 14 fois le nombre de corps élémentaires observés dans les échantillons de premier jet d'urines a été supérieur à celui observé dans les sécrétions génitales. Ce qui n'a pas été le cas chez les femmes où l'on n'a pas noté de différence entre les deux types d'échantillons.

2. COLORATION DE PAPANICOLAOU

La présence d'inclusions en chapeau de gendarme ou de corps élémentaires entourés par un petit halo clair sur les frottis après coloration de Papanicolaou (figures 8 et 9 page 83), ont été des indices évocateurs de l'infection à *Chlamydia trachomatis*.



Photo 8 : Cellules génitales féminines infectées par *Chlamydia trachomatis*
(coloration de Papanicolaou) Grossissement X 400



Photo 9 : Cellules génitales féminines abondamment
Infectées par *Chlamydia trachomatis* (coloration
de Papanicolaou) Grossissement X 400

2.1. *Chlamydia trachomatis* , coloration de Papanicolaou et technique d'immunofluorescence directe

En vue de déterminer la concordance existante entre la technique de l'immunofluorescence directe et la coloration de Papanicolaou pour la détection de *Chlamydia trachomatis*, une répartition des échantillons biologiques en fonction des résultats obtenus par les deux techniques a été réalisée (tableau XXI).

Tableau XXI : Répartition des échantillons biologiques en fonction des résultats obtenus à l'immunofluorescence et à la coloration de Papanicolaou.

PAP	IFD	
	Positif (n = 40)	Négatif (n = 67)
Positif (n = 4)	3 (7,5 pc)	1 (1,5 pc)
Négatif (n = 103)	37 (92,5 pc)	66 (98,5 pc)

• $p = 0,15$ (Différence non significative)

•PAP = Papanicolaou

IFD = Immunofluorescence directe

A l'immunofluorescence directe 40 des 107 échantillons de sécrétions endocervicales utilisés, ont révélé des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis*.

La prévalence par cette technique, de l'infection à *Chlamydia trachomatis* dans la population étudiée a été de 37,4 pc (40/107) .

Par rapport à la coloration de Papanicolaou, seuls 7,5 pc (3/40) des échantillons de sécrétions endocervicales positives à l'immunofluorescence directe, ont présenté des aspects microscopiques compatibles avec une chlamydie.

Des résultats concordants ont été obtenus par les deux techniques dans des proportions de 7,5 pc (3/40) pour les échantillons positifs et 98,5 pc (66/67) pour les échantillons négatifs.

La discordance des résultats a été surtout observée avec les échantillons positifs à l'immunofluorescence directe (92.5 pc).

Les performances de la coloration de Papanicolaou par rapport à la technique de l'immunofluorescence directe sont résumées dans le tableau XXII
page 86

Tableau XXII : Performances de la coloration de Papanicolaou.

PAP	IFD		Se	Sp
	Positif	Négatif		
Positif (nb = 4)	3	1	7,5 pc	98,5 pc
Négatif (nb = 103)	37	66		
Total	40	67		

- *PAP* : Papanicolaou *IFD* : Immunofluorescence *Se* : sensibilité
- *Sp* : spécificité

La coloration de Papanicolaou a montré par rapport à la technique d'immunofluorescence directe, une sensibilité de 7,5 pc et une spécificité de 98,5 pc.

2.2. *Chlamydia trachomatis* et aspect cytologique du col

Afin de noter le caractère inflammatoire de l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis*, la fréquence des réactions inflammatoires du col en association avec la détection de la bactérie a été déterminée (tableau XXIII page 87).

Tableau XXIII : Fréquence des réactions inflammatoires du col avec l'infection à *Chlamydia trachomatis*

Aspect cytologique du col	<i>Chlamydia trachomatis</i> par I F D	
	Positif (nb = 40)	Négatif (nb = 67)
Inflammatoire (nb = 55)	31 (57 pc)	24 (43 pc)
Non inflammatoire (nb = 52)	9 (18 pc)	43 (82 pc)

- *Ordre Ratio (OR) = 6,2*
- *IFD : Immunofluorescence directe*

Les corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* ont été révélés chez 57 pc (31/55) des femmes qui avaient un aspect cytologique inflammatoire de col contre 18 pc (9/52) pour celles chez lesquelles l'aspect du col était normal.

Parmi les femmes qui faisaient une infection génitale à uniquement *Chlamydia trachomatis*, 80 pc ont montré un aspect cytologique inflammatoire du col (tableau XXIV page 88).

Tableau XXIV : Fréquence des réactions inflammatoires du col avec l'infection à uniquement *Chlamydia trachomatis* dans la population d'étude

Aspect cytologique du col	<i>Chlamydia trachomatis</i> par IFD	
	Présence (nb = 25)	Absence (nb = 82)
Inflammatoire (nb = 55)	20 (80 pc)	35 (42,7 pc)
Non inflammatoire (nb = 52)	5 (20 pc)	47 (57,3 pc)

- *Ordre Ratio (OR) = 5,4*
- *IFD : Immunofluorescence directe*

L'aspect cytologique inflammatoire du col a été observé chez 72,4 pc des femmes qui faisaient une infection génitale à uniquement autres agents d'infections sexuellement transmissibles (tableau XXV 89).

Tableau XXV : Fréquence des réactions inflammatoire avec l'infection à uniquement autres agents d'infections sexuellement transmissibles dans la population d'étude

Aspect cytologique du col	<i>Chlamydia trachomatis</i> par I F D	
	Présence (nb = 29)	Absence (nb = 78)
Inflammatoire (nb = 55)	21 (72,4 pc)	34 (43,6 pc)
Non inflammatoire (nb = 52)	8 (27,6 pc)	44 (56,4 pc)

- *Ordre Ratio (OR) = 3,4*
- *IFD : Immunofluorescence directe*

2.3. Coloration de Papanicolaou et les autres agents d'infections sexuellement transmissibles

La capacité de la coloration de Papanicolaou à mettre en évidence des agents d'infections sexuellement transmissibles, autres que *Chlamydia trachomatis*, a été également recherchée (tableau XXVI page 90).

Tableau XXVI : Autres agents d'infections sexuellement transmissibles détectés par la coloration de Papanicolaou versus coloration de Gram.

PAP	Coloration bactériologique (Gram)			
	C (nb = 15)	Gv (nb =8)	Gv + M (nb = 9)	C + Gv (nb = 12)
<i>Candida</i>	7 (46,6 pc)	-	-	3 (25 pc)
<i>G. vaginalis</i>	-	3 (37,5 pc)	2 (22,2 pc)	-

- C = *Candida* Gv = *Gardenella vaginalis* Gv + M = *Gardenella vaginalis* et *Mobiluncus*
- C + Gv = *Candida* et *Gardenella vaginalis* PAP = Coloration de Papanicolaou

Des agents d'infections sexuellement transmissibles autres que *Chlamydia trachomatis* ont été mis en évidence par la coloration de Papanicolaou.

Cette coloration a paru plus sensible avec les échantillons biologiques monomicrobiens (46,6 pc et 37,1 pc) qu'avec les échantillons biologiques polymicrobiens (22,2 pc et 25 pc).

3. IMMUNOGLOBULINES “ A ” ENDOCERVICALES

ANTI- *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

3.1. Immunoglobulines endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* et diagnostic de la chlamydirose

Les performances de la détection des immunoglobulines “ A ” endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* ont été déterminées par rapport à la détection de la bactérie par immunofluorescence directe (tableau XXVII).

Tableau XXVII : Performances de la détection des Immunoglobulines “ A ” endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* dans le diagnostic de la chlamydirose.

Test	IFD			
	Positif	Négatif	Se	Sp
IgA	Positif	7	4	87,5 pc
	Négatif	1	88	
Total	8	92		

▪ *IgA* = Immunoglobuline A

IFD = Immunofluorescence

▪ *Se* = Sensibilité

Sp = Spécificité

Les performances de la détection des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* par rapport à la technique de l'immunofluorescence directe, ont donné une sensibilité de 87 pc et une spécificité de 95,6 pc.

Les performances ont été plus basses (Sensibilité 75 pc et Spécificité 47,8 pc) lorsque les immunoglobulines totales endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* ont été utilisées par rapport aux corps élémentaires en immunofluorescence directe (tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Performances de la détection des Immunoglobulines totales endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* dans le diagnostic de la chlamydirose.

Test	IFD		Se	Sp
	Positif	Négatif		
Ig Totales	Positif	6	75 pc	47,8 pc
	Négatif	2		
Total	8	92		

▪ *Ig = Immunoglobuline*

IFD = Immunofluorescence

▪ *Se = Sensibilité*

Sp = Spécificité

3.2. Immunoglobulines “ A ” et immunoglobulines totales endocervicales *anti- Chlamydia trachomatis*

Les immunoglobulines “ A ” anti-*Chlamydia trachomatis* et les immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis* n’ont pas toujours été présentes ou absentes de façon concomitante dans les échantillons de sécrétions endocervicales (tableau XXIX).

Tableau XXIX : Répartition des échantillons contenant les immunoglobulines “ A ” endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* en fonction de la recherche des immunoglobulines totales endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis*

Immunoglobulines A anti- <i>C. trachomatis</i>	Immunoglobulines totales anti- <i>C.trachomatis</i>	
	Positif	Négatif
Positif (nb = 11)	6 (54,6 pc)	5 (45,4 pc)
Négatif (nb = 89)	48 (53,9 pc)	41 (46,1 pc)

Les corps élémentaires et les immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis* ont été associés aux immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans une proportion de 27,3 pc (3/11).

3.3. Immunoglobulines “ A ” endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* et caractéristiques de la population d'étude.

Les facteurs épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de la population d'étude sont rassemblés dans le tableau XXX.

Tableau XXX : Répartition des échantillons biologiques ayant présenté des immunoglobulines “ A ” anti-*Chlamydia trachomatis* en fonction des facteurs épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de la population d'étude.

Facteurs	Immunoglobulines A anti- <i>Chlamydia trachomatis</i>		
	Positif (nb = 11)	Négatif (nb = 89)	p
• Age			
15-24 ans	6	26	0,28
25-34 ans	1	25	
35-44 ans	3	33	
>45 ans	1	5	
• Cervicite clinique			
Oui	5	24	0,29
Non	6	65	
• Cervicite biologique			
>5 PN/champ	1	10	1
<5 PN/champ	10	79	
• Agents IST			
<i>C. albicans</i>	1	25	0,64
<i>T. vaginalis</i>	1	4	
<i>G. vaginalis</i>	1	10	
<i>C. albicans</i> + <i>G. vaginalis</i>	1	11	

• PN = Polynucléaire

• IST = Infections Sexuellement Transmissibles

Dans le groupe des femmes qui avaient des immunoglobulines “ A ” anti-*Chlamydia trachomatis* endocervicales, la tranche d'âge de 15 à 24 ans a été la plus représentée (6/11). La cervicite clinique a été observée dans une proportion de 45,4 pc (5/11) contre un seul cas de cervicite biologique (nombre de polynucléaires supérieur à 5 par champ d'observation). Par ailleurs, d'autres agents d'infections sexuellement transmissibles ont été mis en évidence à l'examen microscopique direct à l'état frais ou après la coloration de Gram. Ils ont été retrouvés dans 36,4 pc (4/11) en association avec *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons biologiques.

4. DETECTION D'ADN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* PAR LA TECHNIQUE DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)

Les 56,1 pc (264/471) de la population étudiée ont été constitués de femmes. La recherche de *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de sécrétions génitales par la technique de PCR a montré un taux de positivité de 9,6 pc (45/471). Cette positivité s'est traduite par l'amplification d'un fragment de 1073 pb dans les différents échantillons biologiques (figure 10 page 96). L'âge moyen des sujets détectés infectés par *Chlamydia trachomatis* par la réaction de amplification génique a été de 28,5 ans chez les hommes (18 à 35 ans) et de 26,5 ans chez les femmes (18 à 35 ans). Les manifestations cliniques majeures observées ont été l'écoulement urétral chez les hommes et la cervicite chez les femmes. *Chlamydia trachomatis* a été mis en évidence par PCR dans 87,5 pc chez des sujets n'ayant pas d'écoulement génital et dans 75,7 pc chez des femmes ayant une cervicite asymptomatique.

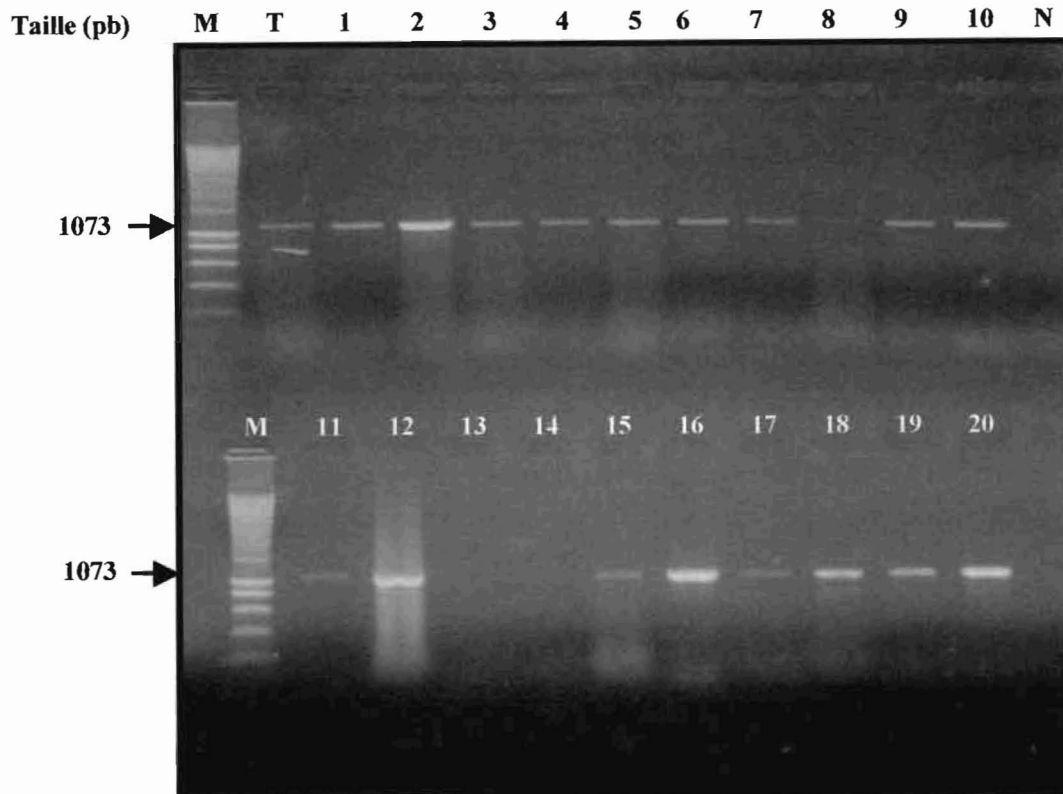


Figure 10 : Electrophorégramme en gel d'agarose à 0,8 pc des produits d'amplification de l'ADN extrait de différents échantillons. Les lignes M correspondent au marqueur de poids moléculaire Smart Ladder . Ligne T: ADN souche de *C. trachomatis* ; lignes 1 à 13 : échantillons de sécrétions endocervicales (échantillon 13 négatif à la PCR) ; lignes 14 à 20 : échantillons de sécrétions urétrales masculines (échantillon 14 négatif à la PCR) ; ligne N : témoin négatif . Les flèches indiquent la taille des amplicons.

Le taux de positivité a été estimée à 3,9 pc (8/207) chez les hommes, et à 14 pc (37/264) chez les femmes (tableau XXXI).

Tableau XXXI : Résultat de la détection d'ADN de *Chlamydia trachomatis* dans la population d'étude.

Résultats PCR	Population (nb = 471)	
	Hommes nb = 207 (43,9 pc)	Femmes nb = 264 (56,1 pc)
Positifs (nb = 45)	8 (3,9 pc)	37 (14 pc)
Négatifs (nb = 426)	199 (96,1 pc)	227 (86 pc)

III. GENOTYPAGE

Après hydrolyse par *AluI*, 37 des 45 amplicons typés ont montré un profil de restriction visualisé par migration électrophorétique en gel d'agarose. (figures 11, 12, 13 ; pages 98, 99, 100). Ce résultat a conféré au typage par PCR/RFLP des souches de *Chlamydia trachomatis*, un taux de réussite de 82,2 pc.

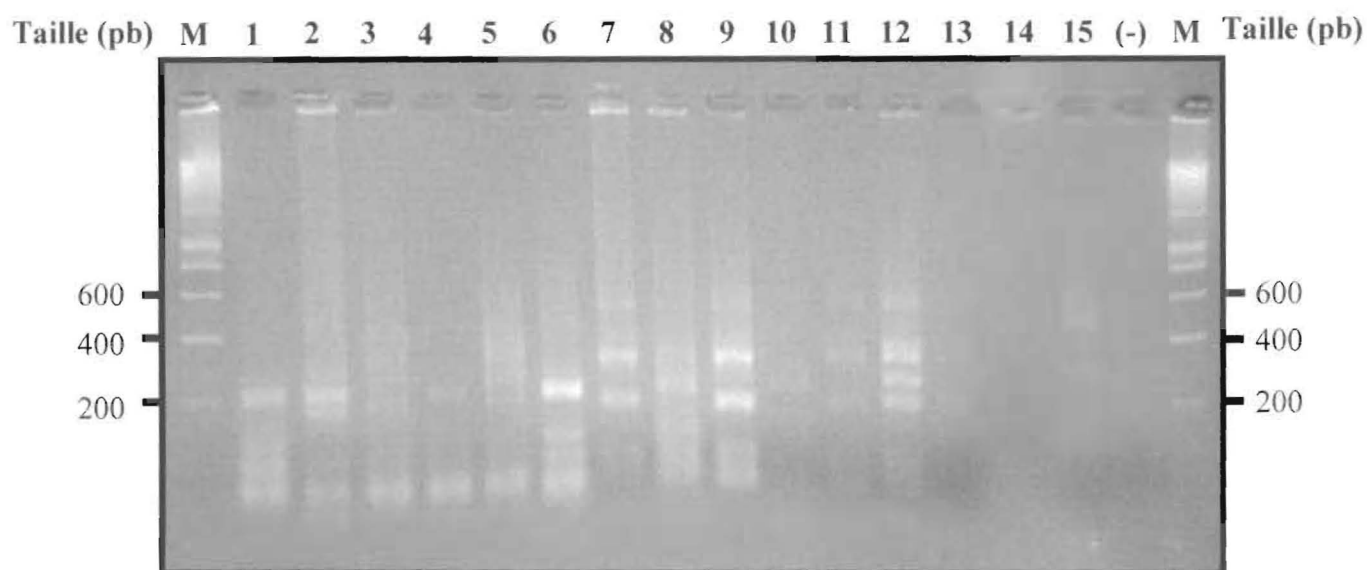


Figure 11 : Electrophorégramme en gel d'agarose à 3 pc en TAE montrant les profils de digestion enzymatique par *AluI* des produits d'amplification des gènes *omp1* de *C. trachomatis* à partir des échantillons biologiques n° 1 à 15 positifs à la PCR. Lignes M = marqueur de poids moléculaire (SmartLadder, Eurogentec) ; lignes 1 à 15 = amplicons obtenus à partir des échantillons de sécrétions endocervicales ; ligne (-) = témoin négatif de digestion.

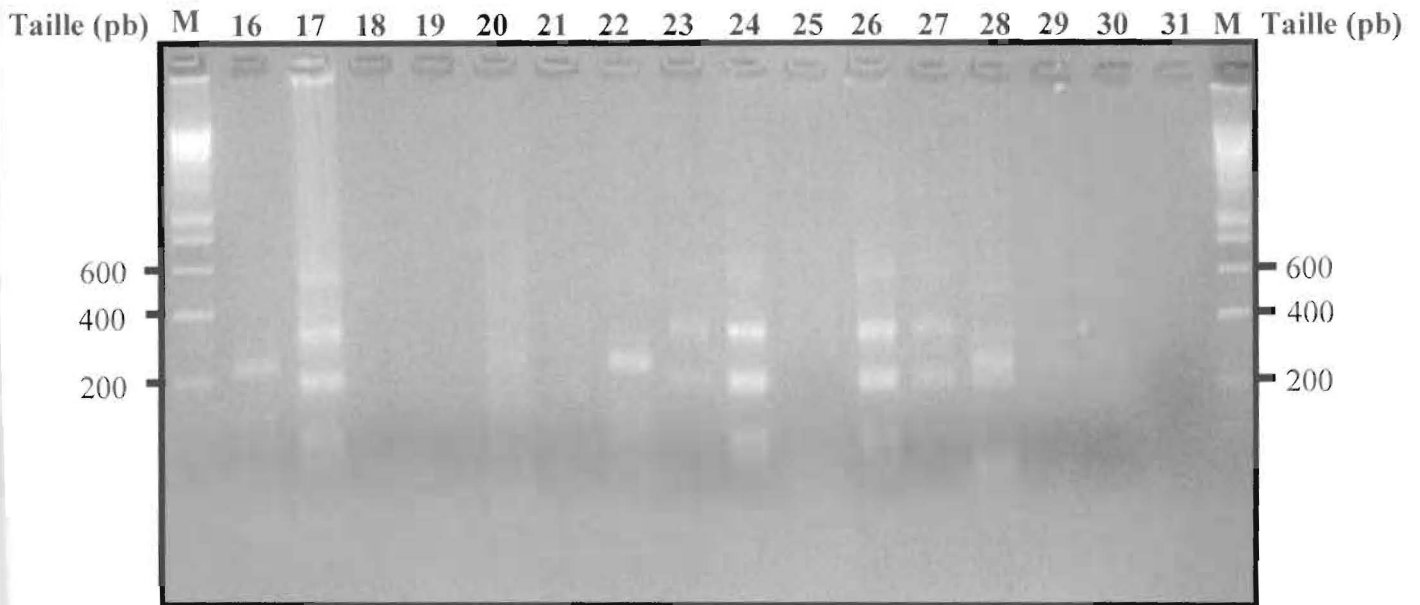


Figure 12 : Electrophorégramme en gel d'agarose à 3 pc en TAE montrant les profils de digestion enzymatique par *AluI* des produits d'amplification des gènes *omp1* de *C. trachomatis* à partir des échantillons n° 16 à 31 positifs à la PCR. Lignes M = marqueur de poids moléculaire (SmartLadder, Eurogentec) ; lignes 16 à 29 = amplicons obtenus à partir des échantillons de sécrétions endocervicales ; lignes 30 et 31 = amplicons obtenus à partir des échantillons de sécrétions urétrales.

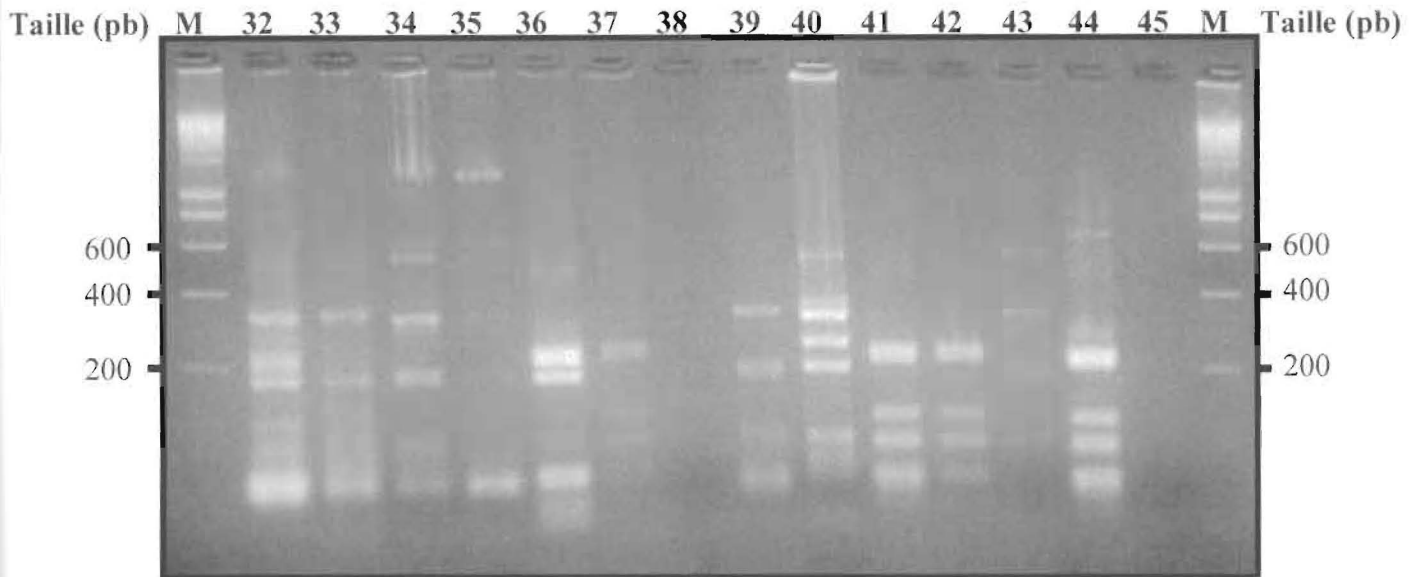


Figure 13 : Electrophorégramme en gel d'agarose à 3 pc en TAE montrant les profils de digestion enzymatique par *AluI* des produits d'amplification des gènes *omp1* de *C. trachomatis* à partir des échantillons n° 32 à 45 positifs à la PCR. Lignes M = marqueur de poids moléculaire (SmartLadder, Eurogentec) ; lignes 32 à 37 = amplicons obtenus à partir des échantillons de sécrétions urétrales ; lignes 38 à 45 = amplicons obtenus à partir des échantillons de sécrétions endocervicales.

1. DIFFERENTS GENOTYPES OBSERVES

Les échantillons biologiques ont été regroupés en six différents profils de restriction (tableau XXXII).

Tableau XXXII : Répartition des échantillons biologiques en fonction des différents génotypes observés.

Numéro échantillons	Génotype	Effectif
1-6-37-41-42-44	L2/L2a	6 (16,2 pc)
2-28-36	D/Da	3 (8,1 pc)
3-5-12-40	F	4 (10,8 pc)
4-8-10-16-20-22-29	L1	7 (18,9 pc)
32	G	1 (2,7 pc)
7-9-11-13-15-17-21-23-24- 26-27-33-34-35-39-43	Non identifié	16 (43,3 pc)

Parmi ces six profils de restriction, trois ont été identifiés complètement (F, G, L1) et 2 partiellement (L2/L2a, D/Da). Le profil non identifié a été le plus prévalent. Il n'a pas pu être identifié, car l'image obtenue après la migration sur gel, n'était identique à aucun des profils connus et publiés pour les souches de référence.

2. GENOTYPES OBSERVES ET TYPE D'ECHANTILLONS

Les différents génotypes obtenus ont été répartis par rapport au sexe (tableau XXXIII).

Tableau XXXIII: Répartition des génotypes observés en fonction du type d'échantillons biologiques.

Génotypes	Sécrétions urétrales masculines		Sécrétions endocervicales	
	Effectif (n = 6)	pc	Effectif (n = 31)	pc
L2/L2a	1	16,7	5	16,1
D/Da	1	16,7	2	6,5
F	0	-	4	12,9
L1	0	-	7	22,6
G	1	16,7	0	-
Autre	3	50	13	42

Le génotype G a été retrouvé uniquement dans les échantillons de sécrétions urétrales chez les hommes et les génotypes F et L1 dans les échantillons de sécrétions endocervicales.

3. GENOTYPES ET DIFFERENTS COMPLEXES DEFINIS PAR YUAN

L'analyse des communautés antigéniques de la protéine majeure de la membrane externe a permis le regroupement des souches de *Chlamydia trachomatis* en 3 complexes : le complexe B (B, Ba, D, E, L1 et L2), le complexe C (A, C, H, I, J, K et L3) et le complexe intermédiaire (F et G).

Les géotypes observés ont été alors répartis suivant ces 3 complexes (tableau XXXIV).

Tableau XXXIV : Répartition des géotypes identifiés en fonction des trois différents complexes définis par Yuan [Yuan *et al.*, 1989]⁽²²⁹⁾.

Complexes	Géotypes	Effectif
B	D/Da – L2/L2a – L1	16 (76,2 pc)
C	-	-
Intermédiaire	F - G	5 (23,8 pc)

La plupart des géotypes identifiés (76,8 pc) appartiennent au complexe B. Aucun géotype du complexe C n'a été identifié.



CHAPITRE II

DISCUSSION

Le présent travail a eu pour but d'améliorer le diagnostic de la chlamydie génitale et de caractériser les souches de *Chlamydia trachomatis* circulant en Côte d'Ivoire.

Dans le cadre de l'amélioration du diagnostic, nous avons essayé d'isoler la bactérie sur lignée cellulaire Mac Coy. Nous avons également utilisé des échantillons non conventionnels et des méthodes non normalisées pour poser le diagnostic de l'infection à savoir :

- les échantillons de premier jet d'urines en comparaison des échantillons de sécrétions génitales;
- la coloration cytologique de Papanicolaou;
- la recherche des immunoglobulines sécrétoires A endocervicales ;
- l'amplification génique par PCR.

■ Les performances de la culture cellulaire en terme de sensibilité et de spécificité, n'ont pu être calculées puisque cette méthode de détection a été utilisée seule. Cependant, la culture a été effectuée avec un taux de succès de 86,5 pc (1316/1522), taux représentant l'ensemble des cultures dont les résultats ont fait l'objet d'une interprétation fiable. Ce taux observé est supérieur à celui compris entre 75 pc et 80 pc indiqué en Angleterre par Ridgway [Ridgway *et al.*, 1991]⁽¹⁷⁰⁾. Il est aussi supérieur à ceux de Van Dyck [Van Dyck *et al.*, 1992]⁽²¹²⁾ qui ont été de 62 pc chez les prostituées et de 76 pc chez les femmes enceintes au Sénégal.

Pour cet essai d'isolement de *Chlamydia trachomatis* un seul échantillon de sécrétions endocervicales par patiente a été analysé. Barnes [Barnes *et al.*, 1990]⁽¹⁵⁾ aux Etats-Unis, a montré que la sensibilité de la culture est améliorée de 70 à 80 pc lorsque au moins deux échantillons de sécrétions endocervicales par patiente sont utilisés.

Les résultats de certains échantillons n'ont pu faire l'objet d'une interprétation fiable, par absence de cellules vivantes ou de tapis cellulaire. La plupart des échantillons pour lesquels cette remarque a été faite contenaient du sang. Ce résultat démontre le caractère cytotoxique et peut-être cytolytique du sang sur les cellules Mac Coy. Toutefois, un phénomène analogue a été observé avec quelques échantillons n'ayant présenté aucune particularité. Cela peut s'expliquer, comme l'a proposé David [David, 1990]⁽⁵³⁾, par la présence dans ces échantillons de sécrétions vaginales contenant une forte concentration de bactéries dont les produits du métabolisme sont toxiques pour les lignées cellulaires. Enfin, des facteurs méconnus peuvent aussi avoir été à l'origine de la mort des cellules Mac Coy. L'absence de tapis cellulaire peut être la conséquence d'un décollement du tapis cellulaire au cours des étapes de lavages et de coloration. Ce phénomène est bien connu lorsque l'immunofluorescence directe est utilisée [Taylor-Robinson, 1992]⁽²⁰⁵⁾.

L'isolement de *Chlamydia trachomatis* a été réalisé chez des femmes symptomatiques. La prévalence de 10,8 pc observée est inférieure à celle de 13,7 pc obtenue par Sanon [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾ au cours d'une étude effectuée à Abidjan, dans une population identique. Au Sénégal, une étude menée par Van Dyck [Van Dyck *et al.*, 1992]⁽²¹²⁾ chez des femmes enceintes et des prostituées, et utilisant la culture cellulaire, a montré respectivement des prévalences de 14,6 pc et de 14,3 pc. De même, Barnes [Barnes, 1989]⁽¹⁴⁾ a obtenu par la même technique dans une population féminine à risque aux Etats-Unis, une prévalence de 24,6 pc.

L'importance de l'infection chlamydienne a déjà été indiquée à Abidjan. En effet, une enquête sérologique réalisée à Abidjan [Faye-Kétté *et al.*, 1996a]⁽⁷¹⁾ a montré que les 70 pc des femmes de cette même population, avaient des anticorps anti-*Chlamydia* à un titre supérieur ou égal à 64.

Une prévalence relativement élevée de l'ordre de 30 pc a été également retrouvée chez des femmes ayant une cervicite [Faye-Ketté *et al.*, 1996b]⁽⁷²⁾. Les différences observées entre ces taux et celui de cette étude sont probablement liées aux techniques utilisées. En effet, Sanon [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾ a utilisé l'immunofluorescence directe comme technique de détection, alors que nous avons utilisé ici la culture cellulaire qui, bien que lourde et chère, demeure la méthode de référence avant le développement des techniques de Biologie Moléculaire qui tendent à la remplacer à l'heure actuelle.

La plupart des échantillons analysés ont montré des inclusions de petite et moyenne tailles. Ce résultat peut être lié, soit à la durée trop longue de conservation des échantillons à -80°C, soit à la durée courte d'incubation des cellules après leur inoculation, soit au fait que un seul passage a été effectué par échantillon sur lignée cellulaire. En ce qui concerne la conservation prolongée des échantillons à -80°C, son influence sur la culture cellulaire est bien connue. En effet, des auteurs comme Mahony [Mahony *et al.*, 1985]⁽¹²¹⁾ ont décrit le rôle du délai de conservation sur la viabilité des Chlamydia.

Pour des raisons d'ordre technique, les échantillons ont été ensemencés après douze mois de conservation à -80°C. Ce délai de conservation peut expliquer la taille des inclusions observées. Quant à la durée d'incubation des cellules après inoculation, celle-ci a été de 48 heures. La durée classique du cycle de multiplication de *Chlamydia trachomatis* étant de 48 à 72 heures, certaines souches qui sont de croissance lente n'ont pu atteindre leur maturité. Un prolongement de l'incubation aurait permis une meilleure expression de ces souches car, comme le souligne Barnes [Barnes *et al.*, 1990]⁽¹⁵⁾, la probabilité d'obtenir de grosses inclusions au premier passage est moins élevée que lors du deuxième passage, d'où la nécessité d'en effectuer plus d'un.

Au cours de l'essai d'isolement de *Chlamydia trachomatis*, des difficultés ont été rencontrées.

Elles ont essentiellement concerné l'acquisition et la manipulation des cellules. Les cellules pendant la manipulation au laboratoire, ont perdu leur pouvoir d'adhérence. Ceci a été la conséquence d'une altération du milieu d'entretien des cellules par appauvrissement en facteurs de croissance et d'une rupture de la chaîne de froid. Dans le premier cas, l'enrichissement du milieu avec du sérum de veau fœtal à une concentration de 10 pc a permis aux cellules de recouvrer leur pouvoir d'adhérence. Dans le deuxième cas, un nouvel approvisionnement en cellules Mac Coy a été nécessaire. Pendant une période de deux mois, les cellules ont été contaminées par une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline et aux aminoglycosides. Cette souche probablement de contamination croisée, a pu affecter les cellules par l'intermédiaire de la verrerie utilisée. En effet, cette verrerie était recyclée et conditionnée au même endroit que la verrerie utilisée pour réaliser le diagnostic des infections hospitalières. Une contamination du matériel de culture cellulaire a pu survenir à ce moment-là. La contamination a été enrayée par l'adjonction de vancomycine au milieu de culture cellulaire et par le recyclage et le conditionnement dorénavant de la verrerie utilisée à un endroit séparé. L'approvisionnement en lignées cellulaires n'a pas été aisé. Les fournisseurs étant hors d'Afrique, ceci a élevé le coût de la lignée cellulaire. Entre la commande et la réception de la lignée cellulaire, de longs délais d'attente (au moins 3 semaines) entraînant souvent une interruption momentanée des manipulations ont été observés. Les mauvaises conditions d'acheminement des lignées cellulaires ont souvent affecté leur qualité à l'arrivée.

■ En remplacement des échantillons de sécrétions génitales qui sont souvent douloureux et traumatisants pour les patients, plusieurs auteurs ont proposé les échantillons de premier jet d'urines [Caul *et al.*, 1988 ; Chernesky *et al.*, 1990 ; 1994 ; Ehret *et al.*, 1993 ; Lauderdale *et al.*, 1999 ; Mahony *et al.*, 1992 ; Scieux, 1991 ; Sellors, 1991]^(42, 44, 45, 66, 111, 123, 187, 189).

Des échantillons de premier jet d'urines ont été alors comparés à des échantillons de sécrétions génitales pour la détection de *Chlamydia trachomatis* par la technique de l'immunofluorescence directe.

L'immunofluorescence permet de mettre en évidence les corps élémentaires extracellulaires à l'aide d'anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux utilisés sont dirigés soit contre la protéine majeure de la membrane externe, antigène de type Mycotak de Syva (USA), Pathfinder de Kallestad (USA), Monofluor (USA), soit contre le lipopolysaccharide de paroi, qui est un antigène de genre (Imagen / USA), soit contre les deux antigènes à la fois (Clonatec / France). La majorité de ces tests d'immunofluorescence directe présente une bonne sensibilité lorsqu'ils sont comparés aux autres méthodes de détection de *Chlamydia trachomatis* à savoir la recherche des inclusions cytoplasmiques sur frottis colorés au Giemsa ou les réactions immuno-enzymatiques type ELISA. Une étude comparative de la sensibilité de 29 trousse de détection des infections à *Chlamydia trachomatis*, récemment réalisée par Bianchi [Bianchi *et al.*, 1998]⁽²⁷⁾ dans le cadre d'une réévaluation pour l'Agence du médicament en France, a permis de montrer que les trousse de Biologie Moléculaire présentent une excellente sensibilité. Elles tendent actuellement à disputer à la culture sa place de technique de référence. Cependant, la plupart des trousse d'immunofluorescence directe testées ont une bonne sensibilité.

Elles détectent la présence de moins de 10 corps élémentaires ; ce constat a été également fait par Thomas [Thomas *et al.*, 1999]⁽²⁰⁹⁾. Les trousse d'immunofluorescence doivent alors être privilégiées par rapport aux techniques ELISA.

Toujours selon Bianchi [Bianchi *et al.*, 1998]⁽²⁷⁾ les tests immunoenzymatiques manquent dans leur ensemble, de sensibilité et ne deviennent positifs que lorsque l'échantillon biologique contient plus de 50 corps élémentaires au moins.

L'immunofluorescence demeure donc une bonne technique alternative dans le diagnostic des infections génitales à *Chlamydia trachomatis* lorsque la culture ou les méthodes de Biologie Moléculaire ne sont pas disponibles. Les techniques de Biologie Moléculaire, en particulier les techniques d'amplification génique, présentent la meilleure sensibilité et permettent de détecter moins de 1 corps élémentaire dans les sécrétions génitales tendant de ce fait à devenir le "standard d'or". La culture cellulaire est la méthode de référence car elle permet de mettre en évidence la vitalité des bactérie [Bankolé, 1997]⁽⁸⁾. Mais, elle est lourde et sa sensibilité est de 70 à 80 pc. Celle-ci est améliorée lorsque plusieurs passages sont effectués [Barnes *et al.*, 1990]⁽¹⁵⁾. Tous ces procédés diagnostiques nécessitent des échantillons de bonne qualité. Les échantillons de sécrétions génitales riches en cellules épithéliales se prêtent à toutes ces méthodes. Cependant, ces échantillons sont invasifs. Les échantillons de premier jet d'urines sont non invasifs et capables de donner des résultats superposables à ceux des échantillons de sécrétions génitales chez les hommes. L'utilisation alors des échantillons de premier jet d'urines en remplacement des échantillons de sécrétions génitales est salutaire.

La détection de l'antigène de *Chlamydia trachomatis* par immunofluorescence directe, dans les échantillons de premier jet d'urines de 73 hommes et de 38 femmes, a montré une bonne sensibilité comparée aux échantillons de sécrétions urétrales chez l'homme. Chez la femme, la sensibilité a été moins bonne.

Les performances obtenues corroborent celles de Taylor-Robinson [Taylor-Robinson, 1996]⁽²⁰⁶⁾ qui a montré que les résultats observés avec les échantillons de premier jet d'urines sont superposables à ceux obtenus avec les échantillons de sécrétions urétrales chez les hommes quelle que soit la méthode utilisée. Chez l'homme, les résultats des échantillons de premier jet d'urines suffisent donc pour poser le diagnostic de l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis*. Par contre chez la femme, les résultats des échantillons de premier jet d'urines sont moins bons et nécessitent l'utilisation de méthodes plus sensibles telle que la culture cellulaire ou la Biologie Moléculaire. Chez celles-ci, la recherche des corps élémentaires dans les échantillons de premier jet d'urines doit toujours être complétée par une recherche au niveau de l'endocol.

Les prévalences de *Chlamydia trachomatis* obtenues dans cette population sont estimées à 22 pc chez les hommes et à 26 pc chez les femmes. La prévalence observée chez les hommes, est inférieure à celle de 28,4 pc indiquée par Sanon [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾ qui a utilisé la même technique sur des populations similaires. La prévalence de 26 pc chez les femmes est élevée par rapport à celle de 13,7 pc notée par Sanon [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾, et à celle de 10,8 pc obtenue en culture cellulaire par Bankolé [Bankolé *et al.*, 2001]⁽⁹⁾. La différence observée peut s'expliquer par les techniques utilisées d'une part, et d'autre part par les tailles des populations d'étude.

Le nombre de corps élémentaires observés dans les deux types d'échantillons est généralement compris entre 5 et 10 aussi bien chez les hommes que chez les femmes, montrant ainsi la pauvreté des échantillons en corps élémentaires.

Cette situation peut être liée à certains facteurs pouvant influencer la quantité d'antigène ou de corps élémentaires dans les prélèvements. Ces facteurs sont connus et décrits [Thomas *et al.*, 1999]⁽²⁰⁹⁾.

Il s'agit de la qualité des échantillons, des modalités de transport et de stockage des produits biologiques, de la sensibilité de la technique utilisée et même du traitement antibiotique préalablement reçu par le patient. En aucun cas n'intervient le caractère symptomatique ou asymptomatique de l'infection. L'absence de cervicite chez 70 pc des femmes ayant une infection à *Chlamydia trachomatis* confirme le caractère pauci-symptomatique de cette infection. Enfin, l'absence d'écoulement génital chez plus de 80 pc des hommes ayant une infection à *Chlamydia trachomatis* corrobore le caractère subaigu de l'urétrite à *Chlamydia trachomatis*.

■ En Côte d'Ivoire, les praticiens des consultations en gynécologie réalisent souvent chez les femmes présentant d'écoulement génital, des frottis cervico-vaginaux pour la recherche d'une dysplasie cervicale après coloration de Papanicolaou. Le coût financier des examens de laboratoire reviendra moins cher si les frottis ainsi colorés, peuvent offrir en même temps l'occasion de poser le diagnostic microbiologique de la chlamydie, infection sexuellement transmissible très fréquente. Des échantillons de sécrétions endocervicales ont été soumis à cette coloration dans le but de comparer son efficacité à celle de l'immunofluorescence directe à poser le diagnostic de la chlamydie.

Un taux de succès de 7,5 pc a été obtenu. Ce taux est inférieur à ceux de Froster et de Sonja [Froster *et al.*, 1985 ; Sonja *et al.*, 1985]^(75, 191). Le premier auteur a estimé le taux de succès à 13 pc sur un effectif de 45 patients reconnus infectés par *Chlamydia trachomatis* à l'immunofluorescence directe. Quant au second auteur, il n'a pas indiqué la taille de la population d'étude.

Il a cependant rapporté que dans les infections à *Chlamydia trachomatis* reconnues après culture cellulaire, la coloration de Papanicolaou ne montre de signes en faveur d'une chlamydie que dans 20 pc des cas.

La prévalence de 37,4 pc retrouvée à l'immunofluorescence directe est très élevée et identique à celle de Froster [Froster *et al.*, 1985]⁽⁷⁵⁾. Cela peut s'expliquer par l'excellente sensibilité de la technique de l'immunofluorescence par rapport à la culture, à diagnostiquer l'infection à *Chlamydia trachomatis* [Barnes, 1989 ; Black, 1997 ; Dean *et al.*, 1998 ; Mahony, 1994 ; Taylor-Robinson *et al.*, 1996]^(14, 32, 56, 124, 206).

La coloration de Papanicolaou a montré une sensibilité très faible (7,5 pc). Ce résultat confirme celui de Sonja [Sonja *et al.*, 1985]⁽¹⁹¹⁾ qui avait émis des réserves quant à l'utilisation de cette technique pour le diagnostic de la chlamydie. Yoshio [Yoshio, 1985]⁽²²⁷⁾ avait eu la même attitude lorsqu'il affirmait que le cytodagnostic d'infections à *Chlamydia* n'est pas aisé. Pour lui, toute inclusion cytoplasmique ne peut être attribuée uniquement aux *Chlamydia*. Cette sensibilité de la coloration de Papanicolaou repose le problème d'efficacité des tests utilisés en général pour le diagnostic biologique de la chlamydie génitale [Bianchi *et al.*, 1998]⁽²⁷⁾.

Au plan cytologique, la coloration de Papanicolaou a révélé chez plus de la moitié (55/107) de la population d'étude un aspect inflammatoire du col. Dans les 81,82 pc (45/55) nous avons noté une infection génitale associée à cet aspect cytologique du col.

Ce constat est en accord avec les résultats de Veena [Veena *et al.*, 1995]⁽²¹³⁾ qui a estimé l'association " inflammation du col utérin et infection génitale " à 81 pc. Le fort taux (57 pc) d'association de *Chlamydia* à l'aspect inflammatoire du col, traduit bien la manifestation clinique le plus souvent observée dans la chlamydie génitale.

En dehors de *Chlamydia*, d'autres agents d'infections sexuellement transmissibles, ont été notés sur les frottis après la coloration de Papanicolaou. Il s'agit des agents de vaginoses (33,3 pc) et des agents de candidoses (66,7 pc). Sous réserve d'utilisation de techniques appropriées de détection de ces agents en comparaison, nous pouvons noter la capacité de la coloration de Papanicolaou à poser le diagnostic de ces infections comme l'a indiqué Ronald [Ronald *et al.*, 1999]⁽¹⁷⁴⁾.

■ Comme les autres microorganismes, *Chlamydia trachomatis* induit la synthèse d'immunoglobulines dans l'organisme hôte. McComb et Brunham [McComb *et al.*, 1979 ; Brunham *et al.*, 1981]^(132, 37) ont noté une bonne corrélation entre *Chlamydia trachomatis* et les immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de sécrétions génitales des femmes infectées.

Afin de situer le rôle des immunoglobulines A sécrétoires anti-*Chlamydia trachomatis* dans le diagnostic de la chlamydie génitale chez la femme en Côte d'Ivoire, 100 échantillons de sécrétions endocervicales ont fait l'objet d'une recherche concomitante de ces immunoglobulines et de l'antigène chlamydien.

La prévalence des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans la population d'étude a été de 11 pc. Elle est inférieure à celle de 19,2 pc obtenue par Witkin [Witkin *et al.*, 1997]⁽²²⁶⁾ aux Etats Unis dans une population de 167 femmes enceintes.

Elle est par contre supérieure à 5,8 pc signalée par Thejls [Thejls *et al.*, 1995]⁽²⁰⁷⁾ qui a travaillé également sur une population de femmes enceintes mais de taille plus grande (1078 personnes) en Suisse.

La forte prévalence de 54 pc observée pour les immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis* peut être le résultat d'une cicatrice sérologique, nombreuses femmes de la population d'étude ayant été probablement en contact avec la bactérie.

Il peut également s'agir des immunoglobulines induites par d'autres espèces n'appartenant pas au genre *Chlamydia* notamment *Chlamydophila psittaci* et *Chlamydophila pneumoniae*, qui présentent des communautés antigéniques avec *Chlamydia trachomatis* [Biendo *et al.*, 1994 ; Patel *et al.*, 1995]^(28, 153).

La spécificité de 47,8 pc et la valeur prédictive positive de 11 pc obtenues pour la recherche de cette catégorie d'immunoglobulines reflètent surtout la deuxième hypothèse. Un titrage et une identification assez poussée de ces anticorps aurait permis de confirmer l'une ou l'autre de ces deux éventualités.

La corrélation entre la présence des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* et des particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* a été surtout observée dans la tranche d'âge de 15 à 24 ans. Ce résultat corrobore celui de Thejls [Thejls *et al.*, 1995]⁽²⁰⁷⁾. Parmi les 11 femmes qui avaient des immunoglobulines A, 7 (63,6 pc) ont été concernées par cette observation. Nombreux auteurs ont indiqué une corrélation entre les immunoglobulines A sécrétoires et l'infection. En effet, Thierry [Thierry *et al.*, 1975]⁽²⁰⁸⁾ a démontré que la présence des immunoglobulines au niveau vaginal était le témoin d'une infection active qu'un moyen de défense anti-infectieux. De même, Barguelli [Barguelli *et al.*, 1993]⁽¹³⁾ a noté que la présence d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans les sécrétions endocervicales était la réponse à une infection haute telle une salpingite ou une périhépatite.

Enfin Tanikawa [Tanikawa *et al.*, 1996]⁽²⁰⁴⁾ a trouvé au Japon que les 47,1 pc des femmes stériles par obstruction tubaire due à la chlamydie génitale, étaient porteurs d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis*.

La présence d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* non en association avec les immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis*, peut traduire une chlamydie débutante, surtout que cette remarque a été faite avec des femmes jeunes et qui n'ont présenté ni cervicite clinique ni cervicite biologique.

Dans les cas d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* non en association avec l'antigène chlamydien, il peut s'agir soit d'un cas de guérison récente non suivie encore de l'affaissement du taux des immunoglobulines A, soit d'une infection haute ne pouvant pas induire la synthèse d'immunoglobulines au niveau cervical [Patel *et al.*, 1995]⁽¹⁵³⁾. Une étude de la cinétique de ces immunoglobulines aurait permis d'apporter la confirmation de l'une ou l'autre de ces deux éventualités.

La sensibilité de 87,5 pc obtenue est moins élevée que celle de Witkin [Witkin *et al.*, 1997]⁽²²⁶⁾ qui a utilisé comme méthode de référence la technique immunoenzymatique et a trouvé 95,7 pc. Ce résultat repose le problème de sensibilité des tests utilisés en général pour le diagnostic biologique de la chlamydie génitale [Bianchi *et al.*, 1998]⁽²⁷⁾.

La cervicite a été moins présente avec l'infection (cervicite clinique 45,4 pc et cervicite biologique 9,1 pc). Cela traduit le caractère asymptomatique observé le plus souvent dans les infections génitales à *Chlamydia trachomatis*. Enfin, l'association de particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* à d'autres agents de vaginite et / ou de vaginose n'a nullement entravé l'induction des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis*; ce qui prouve le caractère discriminant de ces immunoglobulines et par conséquent leur pouvoir à poser le diagnostic de la chlamydie génitale en cas d'infection mixte.

■ Compte tenu de l'évolution insidieuse de la chlamydie génitale [Hugues *et al.*, 1989]⁽⁹⁸⁾, seule la détection précoce de la bactérie par une méthode de diagnostic sûre et sensible en vue d'un traitement rapide permet de réduire l'impact de l'affection.

L'amplification génique est considérée aujourd'hui comme la meilleure technique de " screening " des infections sexuelles à *Chlamydia trachomatis* en raison de ses performances notamment sa sensibilité [Claas *et al.*, 1991]⁽⁴⁸⁾.

En effet la bactérie inactivée, même tuée par un traitement antibiotique peut être détectée par la technique tant que l'ADN cible demeure dans l'échantillon. Les oligonucléotides dérivées de gènes *omp* [Bobo *et al.*, 1990]⁽³⁴⁾, de gènes codant pour les ARN ribosomiaux [Claas *et al.*, 1991]⁽⁴⁸⁾ ou du plasmide cryptique de *Chlamydia trachomatis* [Mahony *et al.*, 1990 ; Ostergaard *et al.*, 1990 ; Ratti *et al.*, 1991]^(122, 148, 168) confèrent à la technique une bonne spécificité.

Les échantillons de sécrétions génitales de 264 femmes et de 207 hommes ont été l'objet de cette technique par PCR. La prévalence de l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis*, a été estimée à 3,9 pc chez les hommes et à 14 pc chez les femmes. Cette prévalence de *Chlamydia trachomatis* chez les hommes est largement inférieure à celle de 28,4 pc indiquée par Sanon [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾ qui a travaillé sur une population identique. L'écart observé entre les prévalences peut s'expliquer par la différence entre les techniques utilisées, mais aussi par d'autres facteurs :

- certains échantillons ayant généré des bandes à la limite du visible sur gel d'agarose, auraient été considérés comme négatifs. L'utilisation de sondes d'hybridation ou une réaction de " nested-PCR " [Radouani *et al.*, 1997]⁽¹⁶⁴⁾ auraient pu permettre de les mettre en évidence ;

▪ la qualité de certains échantillons utilisés ; le prélèvement au moyen d'écouvillon abrasif étant douloureux et traumatisant pour les patients [Caul *et al.*, 1988]⁽⁴²⁾, certains échantillons étaient dépourvus de cellules. Une recherche de la β globine [Bauwens *et al.*, 1993 ; Coutlée *et al.*, 2000]^(19, 51) dans tous les échantillons biologiques utilisés, aurait pu permettre de sélectionner les échantillons pourvus de cellules.

Plusieurs auteurs proposent aujourd'hui les échantillons de premier jet d'urines qui non seulement n'affectent pas la qualité des résultats mais présentent également l'avantage d'être moins douloureux pour les patients [Chernesky *et al.*, 1990 ; 1994 ; Ehret *et al.*, 1993 ; Lauderdale *et al.*, 1999 ; Mahony *et al.*, 1992 ; Sellors, 1991 ; Thomas *et al.*, 1999]^(44, 45, 66, 111, 123, 189, 209) ;

▪ des auteurs comme Bauwens [Bauwens *et al.*, 1993]⁽¹⁹⁾ ont évoqué la présence d'inhibiteurs de l'enzyme réalisant la polymérisation (*Taq polymérase*) dans les échantillons d'origine uro-génitale d'où la nécessité d'utilisation d'un contrôle interne de la réaction.

La prévalence de 14 pc obtenue chez les femmes corrobore celle de Sanon [Sanon *et al.*, 1992]⁽¹⁷⁷⁾. Toutefois, cette prévalence observée aurait pu être élevée s'il n'y avait pas de facteurs entravant la sensibilité de la réaction PCR. Elle est cependant supérieure à 10,8 pc obtenue par Bankolé [Bankolé *et al.*, 2001]⁽⁹⁾. La différence observée, serait surtout liée à la technique ; le dernier auteur ayant utilisé la culture cellulaire, une technique qui ne cible la bactérie que dans sa forme viable.

Enfin les manifestations cliniques majeures liées à la chlamydie génitale dans cette étude ont été la cervicite chez les femmes et l'écoulement urétral chez les hommes. Ces manifestations obtenues dans des proportions respectives de 24,3 pc et 12,5 pc, ont été également observées chez des sujets non infectés par *Chlamydia trachomatis*. C'est la preuve que ces manifestations cliniques ne sont pas que l'apanache de *Chlamydia trachomatis*.

■ En vue de déterminer la circulation des génotypes de *Chlamydia trachomatis* en Côte d'Ivoire, tous les échantillons positifs à l'amplification génique par PCR ont subi une hydrolyse au moyen de l'enzyme *AluI*.

A la fin du typage 5 génotypes différents ont été identifiés. Ce sont les génotypes G, D/Da, F, L2/L2a, L1 dans les proportions respectives de 2,7 pc, 8,1 pc, 10,8 pc, 16,2 pc et 18,9 pc.

Une proportion de 43 pc (13/37) des profils de restriction observés sur gel d'agarose après migration, n'ont pas pu être identifiée. Tous ces profils non identifiés étaient apparemment semblables. Il s'agit probablement d'un même génotype.

Parmi les 45 échantillons positifs à l'amplification génique, 17,8 pc (8/45) n'ont montré aucun profil de restriction après digestion par *AluI*. Cela peut être dû à une quantité faible d'amplicons de 1073 pb produite par ces échantillons au cours de la réaction de PCR. En raison des pertes lors des étapes de purification, la quantité restante d'amplicons n'a probablement pas suffi pour générer des fragments à la limite de la visibilité sur le gel d'agarose après hydrolyse enzymatique.

Au nombre des génotypes dégagés :

▪ deux génotypes (L2/L2a, D/Da) ont été partiellement identifiés. La réalisation d'une deuxième hydrolyse au moyen de l'enzyme *NlaIII* sur les amplicons ayant présenté l'aspect L2/L2a et au moyen de l'enzyme *CfoI* sur les amplicons ayant présenté l'aspect D/Da, permettra d'achever leur identification [Sayada *et al.*, 1991 ; Rodriguez *et al.*, 1993]^(179, 172). En effet, l'utilisation de l'enzyme *NlaIII* permet de faire la différence entre les génotypes L2 et L2a. Cela se traduit par l'apparition pour le génotype L2 de cinq fragments dont les tailles varient de 315 pb à 121 pb. Ce profil se distingue nettement de celui du génotype L2a qui lui génère quatre fragments de taille allant de 436 pb à 177 pb.

Quant aux génotypes D et Da, sous l'action de l'enzyme *CfoI* deux fragments sont observés pour chacun.. Les nombres de paires de bases de ces fragments sont 587 et 408 pour le premier, puis 587 et 483 pour le second.

- Un profil de restriction n'a pu être identifié. Ce profil qu'ont présenté la plupart (43,3 pc) des amplicons, était constitué de trois fragments visibles sur le gel d'agarose. Les tailles approximatives des trois fragments générés sont de 320 pb, 200 pb et 100 pb.

Ce profil de restriction observé ne figure pas au nombre des génotypes majeurs habituels ; il pourrait alors s'agir d'une souche qui aurait connu des mutations au niveau de la zone amplifiée. Le gel d'agarose ne présentant pas les meilleures conditions de stringence pour la séparation des fragments de très petite taille, il se peut qu'il y ait eu de chevauchements non perceptibles des fragments de tailles très proches. Cette situation pourrait augmenter le nombre de fragments de ce profil et le rapprocher du génotype G. Un séquençage de ce fragment *omp1* amplifié permettra de situer la nature et la zone des mutations et par conséquent d'identifier de manière précise ce profil [Morré *et al.*, 1998]⁽¹³²⁾.

- Les génotypes D/Da (8,1 pc) et F (10,8 pc) ont été au nombre des génotypes prédominants. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus notamment en France [Rodriguez *et al.*, 1993]⁽¹⁷²⁾, au Portugal [Borrego *et al.*, 1997]⁽³⁵⁾, en Hollande [Morre *et al.*, 2000]⁽¹³⁷⁾, au Japon [Ikehata *et al.*, 2000]⁽¹⁰⁰⁾, au Sénégal [Sturm-Ramirez *et al.*, 2000]⁽²⁰¹⁾ et en Corée [Choi *et al.*, 2001]⁽⁴⁶⁾,

- Aucune souche responsable de trachome n'a été identifiée. Ce résultat était logique dans la mesure où il s'agissait des échantillons biologiques d'origine génitale.

Cependant, certains auteurs comme Borrego au Portugal, Ikehata au Japon et Bandea en Thaïlande [Borrego *et al.*, 1997 ; Ikehata *et al.*, 2000 ; Bandea *et al.*, 2001]^(35, 100, 7) ont rapporté la présence de génotypes responsables de trachome ou de leurs variants dans les infections génitales. Il s'agit probablement d'une adaptation de ces souches au tractus génital.

- Les génotypes L1 et L2/L2a sont rattachés en général à la lymphogranulomatose vénérienne. Ils sont rarement isolés dans les infections sexuellement transmissibles et en proportions très faibles [Borrego *et al.*, 1997]⁽³⁵⁾.

Leurs fréquences d'isolement ici (18,9 pc et 16,2 pc) pourraient être liées au pouvoir séparateur du gel d'agarose qui ne permet pas une séparation correcte des fragments de petites tailles ; des erreurs d'identification de génotypes pourraient avoir été commises. Ainsi le génotype E pourrait avoir été confondu au génotype L2/L2a et le génotype D/Da au génotype L1 ; ceux-ci appartiennent tous au même complexe B [Yuan *et al.*, 1989]⁽²²⁸⁾. Une étude réalisée en 2000 au Sénégal [Sturm-Ramirez *et al.*, 2000]⁽²⁰¹⁾ un pays voisin de la Côte d'Ivoire, n'avait fait cas d'aucun génotype L2/L2a et L1. Elle avait par contre indiqué les génotypes E et D/Da au nombre des plus prédominants. L'utilisation d'un gel de polyacrylamide aurait permis de réaliser l'identification sans ambiguïté de ces génotypes.

- Les génotypes F et L1 ont été retrouvés uniquement chez les femmes et le génotype G chez les hommes. Compte-tenu des difficultés d'identification génotypique précise de certaines images obtenues à la migration sur gel d'agarose après hydrolyse par *AluI* et du nombre d'échantillons positifs typés, aucun génotype ne peut être statistiquement associé à des facteurs épidémiologiques comme l'âge ou à des facteurs cliniques.

**CONCLUSION
&
PERSPECTIVES**

Comme ailleurs dans le monde, l'infection uro-génitale à *Chlamydia trachomatis* constitue un véritable fléau pour la santé en Côte d'Ivoire. Le présent travail a permis d'explorer plusieurs méthodes de détection de la bactérie dans divers échantillons biologiques afin d'en améliorer le diagnostic d'une part, et d'autre part, d'en détecter les différents génotypes circulants en Côte d'Ivoire.

Au terme du présent travail, il est dès à présent possible en Côte d'Ivoire :

- d'isoler *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire, ouvrant ainsi de nouveaux axes de recherches dont l'étude de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.
- de poser le diagnostic précoce des infections génitales à *Chlamydia trachomatis* par amplification génique, en vue d'un traitement efficace.

La caractérisation des souches de *Chlamydia trachomatis* a permis d'isoler 6 génotypes : L2/L2a, D/Da, F, L1, G et un dernier non identifié montrant ainsi, l'hétérogénéité des souches de *Chlamydia trachomatis* circulant en Côte d'Ivoire.

Des travaux ultérieurs utilisant au moins 5 enzymes de restriction, un gel approprié d'électrophorèse et le séquençage, permettront à coût sûr, une meilleure caractérisation des souches de *Chlamydia trachomatis* en Côte d'Ivoire.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1-ALLAN I., PEARCE J.H.

Aminoacid requirements of strains of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* growing in Mc Coy cells relationship with clinical syndrome and host origin. *J Gen Microbiol* 1983 ; **129** : 2001-7.

2-ALLEN J.E., CERRONE M.C., BEATTY P.R., STEPHENS R.S.

Cysteine-rich outer membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* display compensatory sequence changes between biovariants. *Mol Microbiol* 1990 ; **4** : 1543-1550.

3-AMANN R., SPRINGER N., SCHONHUBER W., LUDWIG W., SCHMID E.N., MULLER K.D.

Obligate intracellular bacterial parasites of *acanthamoeba* related to *Chlamydia* spp. *Appl Environ Microbiol* 1997 ; **68** : 115-121.

4-AN Q., RADCLIFFE G., VASSALLO R., BUXTON D., O'BRIEN W.J., PELLETIER D.A., WEISBURG W.G., KLINGER J.D., OLIVE M.

Infection with a plasmid-free variant *Chlamydia* related to *Chlamydia trachomatis* identified by using multiple assays for nucleic acid detection. *J Clin Microbiol* 1992 ; **30** : 2814-2821.

5-ANDERSON I.E., BAXTER S.I.F., DUNBAR S., PHILIPS H.L., CLARKSON M.J., HERRING A.J.

Analysis of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *Int J Syst Bacteriol* 1996 ; **46** : 245-51.

6-BAEHR W., ZHANG Y.X., JOSEPH T., SU T., NANO F.E., EVERETT K.D.E.

Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genus. *Proc Nat Acad Sci.* 1988 ; **85** : 4000-4004.

7-BANDEA C. I., KUBOTA K., BROWN T. M., KILMARX P. H., BHULLAR V. et al.

Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (*ompl*). *Sex Transm Infect* 2001 ; **77** ; **6** : 419-422.

8-BANKOLE H.

Essai d'isolement de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire en zone tropicale. *Mémoire de DEA/Biologie Humaine Tropicale/UFR-SMA* ; Abidjan 1997 ; 46p

9-BANKOLE H., FAYE-KETTE H., LARUCHE G., DABIS F., DOSSO M., WELFENS-EKRA C.

Etude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomatis* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan. *Bull. Soc. Path. Exot* 2001; **94**, **3** : 235-238.

10-BANKOLE H., FAYE-KETTE H., ADO-MENSAH I., KONAN K., M'BENGUE-KOUASSI A., ACHO Y. B., BOUZID S., DOSSO M.

Diagnostic de l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis* par la coloration de Papanicolaou dans les sécrétions génitales de la femme à Abidjan-Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* (soumis)

11-BANKOLE H., FAYE-KETTE H., WASSOUMBOU S., KAKOU-N'DOUBA A., KOUASSI-M'BENGUE A., BOUZID S., DOSSO M.

Detection des immunoglobulines A endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* chez les femmes présentant des leucorrhées à Abidjan-Côte d'Ivoire.

Bull Soc Pathol Exot (soumis)

12-BARBOUR A.C., MANO K.I., HACKSTAD T., PERRY L., CALDWELL H.D.

Chlamydia trachomatis has penicillin binding proteins bt not detectable muramic acid. *J Bacteriol* 1982 ; **151** : 420-8

13-BARGUELLI F.; FEKI S.; AMOR A.

Intérêt de la recherché des anticorps spécifiques IgA et IgM dans les infections à *Chlamydia trachomatis* de l'adulte. *La Tunisie Médicale* 1993 ; **71** ; 4 : 205-208.

14-BARNES R. C.

Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *J Clin Microbiol Rev* 1989 ; **2** : 119-136.

15-BARNES R. C., KATZ B. P., ROLFS R.T., BATTEIGER B., CAINE V., JONES R. B

Quantitative culture of endocervical *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1990 ; **28** : 774-780

16-BARRY C.E., BRICKMAN T.J., HACKSTADT T.

Hc-I mediated effects on DNA structure: a potential regulator of chlamydial development. *Mol Microbiol* 1993 ; **9** : 273-83.

17-BARWELL C.F.

Some observations on the antigenic structure of psittacosis and lymphogranuloma venereum viruses. I. Preparation and use in complement fixation tests of antisera from different sources. *Brit J Exp Path* 1952 ; **33** : 258-67.

18-BATTEIGER B.E., NEWHALL W.J., JONES R.B.

Differences in outer membrane proteins of the lymphogranuloma venereum and trachoma biovars of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1985 ; **50** : 488-94.

19-BAUWENS J. E., CLARK A. M., STAMM W. E.

Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* endocervical infections by a commercial polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 1993 ; **31** : 3023-3027.

20-BAVOIL P., OHLIN A., SCHACHTER J.

Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1984 ; **44** : 479-85.

21-BAVOIL P., STEPHENS R.S., FALKOW S.

A soluble 60 kiloDalton antigen of *Chlamydia* sp. Is a homologue of *Escherichia coli* Gro El. *Mol Microbiol* 1990 ; **4** : 461-9.

22-BAVOIL P.M.

Determinants of chlamydial pathogenesis and immunity.

In: Miller VL, Kaper JB, Portnoy DA, Isberg RR, ed. "Molecular genetics of bacterial pathogenesis" 1994; chap 19. p. 295-308.

23-BEATTY W.L., MORRISSON R.P., BYRNE G.L.

Persistent *Chlamydia*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994 ; **58** : 686-99.

24-BECKER Y.

The *Chlamydia* : molecular biology of procaryotic obligate parasites of Eucaryocytes. *Microbiol Rev* 1978 ; **42** : 274-306.

25-BEDSON S.P., WESTERN G.T., LEVY SIMPSON S.

Observations of the aetiology of psittacosis. *Lancet* 1930 ; **i** : 235-236.

26-BEEBE J.L., SHARPTON T.R., ZANTO S.N., STEECE R.S., ROGERS C., MOTTICE S.L.

Performance characteristics of Gen-Probe probe Competition Assay used as a supplementary test for the Gen-Probe PAGE 2 assays for détection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1997 ; **35** : 477-8.

27-BIANCHI A., de BARBEYRAC B., BEBEAR C., BUFFET-JANVRESSE C., EB F.

Etude comparative de la sensibilité de 29 trousse de diagnostic direct des infections à *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'agence du médicament. *Rev Fr Lab* 1998 ; **306** : 47-52.

28-BIENDO M., ORFILA J.

Sérodiagnostic de *Chlamydia trachomatis* et de *Chlamydia pneumoniae* : évaluation par comparaison de deux méthodes : microimmunofluorescence et Elisa étude de 250 sérums congolais. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1994 ; **87** ; 2 : 81-84.

29-BIRKELUND S., LUNDEMOSE A.G., CHRISTIANSEN G.

Immunolectron microscopy of lipopolysaccharide in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1989 ; **57** : 3250-3.

30-BIRKELUND S., STEPHENS R.S.

Construction of physical and genetic map of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1992 ; **174** : 2742-7.

31-BIRKELUND S., JOHNSEN H., CHRISTIANSEN G.

Chlamydia trachomatis serovar L2 induces protein tyrosine phosphorylation during uptake by Hela cells. *Infect Immun* 1994 ; **62** : 4900-8.

32-BLACK C.M.

Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; **10** : 160-184.

33-BLACK C.M., JOHNSON J.E., FARSHY C.E., BROWN T.M., BERDAL B.P.

Antigenic variation among strains of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1991 ; **29** : 1312-6.

34-BOBO L.; COUTLEE F.; YOLKEN R. H.; QUINN T. ; VISCIDI R. P.

Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1990 ; **28** : 1968-1973.

35-BORREGO M. J., GOMES J. P., LEFEBVRE J. F., EB F., ORFILA J., CATRY M. A.

Genotyping of Portuguese *Chlamydia trachomatis* urogenital isolates. *Genitourin Med.* 1997 ; **73** ; 6 : 561-563.

36-BRADE L., SCHRAMER S., SCHADE U., BRADE H.

Chemical, biochemical and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1986 ; **54** : 568-74.

37-BRUNHAM R., MARTIN D. H., KUO C. C., WANG S. P., STEVENS C. E., HUBBARD T., HOLMES K. K.

Cellular immune responses during uncomplicated genital infection with *Chlamydia trachomatis* in humans. *Infect. Immun.* 1981 ; **34** : 98-104.

38-CALDWELL H.D., KUO C.C.

Purification of a *Chlamydia trachomatis* specific antigen by immunoabsorption with immunospecific antibody. *J Immunol* 1977; **118** : 437-41.

39-CALDWELL H.D., KROMHOUT J., SCHACHTER J.

Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Imm* 1981; **31**: 1161-1176.

40-CALDWELL H.D., SCHACHTER J.

Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia* spp. *Infect Immun* 1982 ; **35** : 1024-31.

41-CAMPBELL L.A., KUO C.C., GRAYSTON J.T.

Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 1990 ; **58** : 93-7.

42-CAUL E.O.; PAUL I.D.; MILNE J.D.

Non invasive sampling methods for detecting *Chlamydia trachomatis*. *Lancet* 1988 ; **ii** : 1246-1247.

43-CHANG J.J., LEONARD K., ARAD T., PITT T., ZHANG Y.N., ZHANG L.H.

Structural studies of the outer envelope of *Chlamydia trachomatis* by electron microscopy. *J Mol Biol* 1982 ; **161** : 579-90.

44-CHERNESKY M. A.

Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens in urines as alternative to swabs and culture. *J. Infect. Dis.* 1990 ; **160** : 124-126.

45-CHERNESKY M. A. ; JANG D. ; LEE H.

Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in men and women by testing first void urine by ligase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1994 ; **32** : 2682-2868.

46-CHOI T. Y., KIM D. A., SEO Y. H.

Evaluation of serotyping using monoclonal antibodies and PCR-RFLP for *Chlamydia trachomatis* serotype identification. *J. Korean Med. Sci.* 2001 ; **16** ; 1 : 15-19.

47-CLAAS H.C., MELCHERS W.J., de BRUIJN I.H., de GRAAF M., van DIJK W.C., LINDEMAN J., QUINT W.G.

Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990 ; **9** : 864-868.

48-CLAAS H. C. J.; WAGENVOORT J. H. T.; NIESTERS H. G. M.; TIO J. H.; VAN RIJSOORT-VOS J. H.; QUINT W. G. V.

Diagnostic value of the Polymerase Chain Reaction for *Chlamydia* detection as determined in a follow-up study. *J Clin Microbiol* 1991; **29** : 42-45.

49-CLAUSEN J.D., CHRISTIANSEN G., HOLST H.U., BIRKELUND S.

Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol* 1997 ; **25** : 441-9.

50-COX R.L., KUO C.C., GRAYSTON J.T., CAMPBELL L.A.

Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia sp.* strain TWAR to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *Int J Syst Bacteriol* 1988 ; **38** : 265-268.

51-COUTLEE F., DE LADURANTAYE M., TREMBLAY J.V., LABRECQUE L., ROGER M.

An important proportion of genital samples submitted for Chlamydia trachomatis detection by PCR contain small amounts of cellular DNA as measured by β -globin gene amplification. *J Clin Microbiol* 2000 ; **38** ; 7 : 2512-2515.

52-DAILLOUX M., VILLEMAIN P.

Activités bactériostatiques et bactéricides des cyclines, macrolides et fluoroquinolones sur *Chlamydia trachomatis*. *Patho Biol* 1992 ; **40** : 455-60.

53-DAVID H. M.

Chlamydia infections/ Sexually Transmitted Diseases. *Med Clin North Am* 1990 ; **74** : 1367-1387.

54-DEAN D., PATTON M., STEPHENS R.S.

Direct sequence evaluation of the major outer membrane protein gene variant regions of *Chlamydia trachomatis* subtypes D', I' and L'2. *Infect Immun*, 1991 ; **59** : 1579-82.

55-DEAN D., SCHACHTER J., DAWSON C.R., STEPHENS R.S.

Comparison of the major outer membrane protein variant sequence regions of B/Ba isolates: a molecular epidemiologic approach to *Chlamydia trachomatis* infections. *J Infect Dis* 1992 ; **166** : 383-392.

56-DEAN D.; FERRERO D.; McCARTHY M.

Comparison of performance and cost-effectiveness of direct fluorescent-antibody, ligase chain reaction, and PCR assays for verification of chlamydial enzyme immunoassay results for populations with a low to moderate prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 1998 ; **36** : 94-99.

57-DE BARBEYRAC B., DESSUS-BABUS S., POUTIERS F., BEBEAR C.M., ALLERY A., BEBEAR C.

Chlamydia trachomatis : sensibilité et résistance aux antibiotiques.

Méd Mal Infect 1999 ; **29** suppl 1 : 60-67.

58-DESSUS-BABUS S., BELLOC F., BEBEAR C.M., POUTIERS F., LACOMBE F., BEBEAR C. et al..

Antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis* using flow cytometry.

Cytometry 1998 ; **37** : 37-44.

59-DHIR S.P., HENNY G.E., GRAYSTON J.T.

Characterization of the group antigen of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1971 ; **4** : 725-30.

60-DOUGHRI A.M., STORZ J., ALTERA K.P.

Mode of entry and release of *Chlamydia* in infections of intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 1972 ; **126** : 652-7.

61-DUBUIS O., GORGIEVSKI-HRISOHO M., GERMANN D., MATTER L.

Evaluation of 2-SP transport medium for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by two automated amplification systems and culture for *Chlamydia*. *J Clin Pathol* 1997 ; **50** : 947-50.

62-DUTILH B., BEBEAR C.

Diagnostic bactériologique de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire. *Feuille de Biologie* 1987 ; **28** ; 155 : 13-17.

63-EB F., ORFILA J.

Structure antigénique des *Chlamydia*: aspects fondamentaux, applications pratiques. *Bull Inst Pasteur* 1986 ; **84** : 149-76.

64-EB F.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement des infections à *Chlamydia*.

Lett Infect 1995 ; 7 : 290-8.

65-EB F.

Aspects microbiologiques des *Chlamydia*. *Méd Mal Infect* 1999 ; 29 suppl 1 : 6-12.

66-EHRET J. M., LESZCZYNSKI J. C., DOUGLAS J. M., CHERNESKY M., MONCADA J., SCHACHTER J.

Evaluation of Chlamydiazym Immunoassay for detection of *Chlamydia trachomatis* in urines specimens from men. *J. Clin. Microbiol.* 1993 ; 31; 10 : 2702-2705.

67-EISSENBERG L.G., WYRICK P.B., DAVIS C.H., RUMP W.

Chlamydia psittaci elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect Immun* 1983 ; 40 : 741-51.

68-EVERETT K.D.E., HATCH T.P.

Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol* 1995 ; 177 : 877-82.

69-EVERETT K.D., ANDERSEN A.A.

The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1997 ; 47 : 461-73.

70-FAN T., LU H., HUT H., SHI L., Mc CIARTY G.A., NANCE D.M.

Inhibition of apoptosis in *Chlamydia* infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 487-96.

71-FAYE-KETTE H., N'DOBO P., DOSSO M., WELFFENS-EKRA C.
Prévalence des anticorps anti-*Chlamydia trachomatis* chez des femmes infertiles au CHU de Yopougon (Abidjan) : Etude préliminaire.

Communication orale présentée au premier congrès scientifique de la société africaine de microbiologie, février 1996a, Bamako.

72-FAYE-KETTE H., YEBARTH S., DOSSO M., WELFFENS-EKRA C.
Prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis* dans les cervicites à abidjan: Etude préliminaire.

Communication orale présentée au premier congrès scientifique de la société africaine de microbiologie, février 1996b, Bamako.

73-FAYE-KETTE H., ALLANGBA A., BANKOLE H., KOUASSI-M'BENGUE A., BOUZID S., DOSSO M.

Evaluation du premier jet d'urines dans le diagnostic de l'infection à *Chlamydia trachomatis* chez des patientes symptomatiques à Abidjan. *Bio Africa* (sous presse).

74-FROST E.H., DESLANDES S., VEILLEUX S., BOURGAUX-RAMOISY D.

Typing of *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein.

J Infect Dis 1991 ; **163** : 1103-7.

75-FROSTER G. E. ; COOKEY I. ; MUNDAY P. E.; RICHMAN P. I.; JHA R.; COLEMAN D.; THOMAS B. J.; HAWKINS D. A.; EVANS R. T.; TAYLOR-ROBINSON D.

Investigation into the value of Papanicolaou stained cervical smears for the diagnosis of chlamydial cervical infection. *J. Clin. Pathol.* 1985 ; **38** : 399-402.

76-FRUTOS R., PAGES M., BELLIS M., ROIZES G., BERGOIN M.
Pulsed-field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera *Chlamydia*, *Rickettsiella*, and *Parochlamydia*. *J Bacteriol* 1989 ; **171** : 4511-4513.

77-FRIIS R.

Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*. Entry of the parasite and host responses to its development. *J Bacteriol* 1972 ; **110** : 706-2.

78-FUKUSHI H., HIRAI K.

Genetic diversity of avian and mammalian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. *J Bacteriol* 1989 ; **171** : 2850-2855.

79-FUKUSHI H., HIRAI K.

Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* 1992 ; **42** : 306-308.

80-GAMMA C.

Sur l'étiologie de la lymphogranulomatose subaigue. *Nouv Press Méd* 1924 ; **37** : 405-5.

81-GAYDOS C.A., BOBO L., WELSH L., HOOK III E.W., VISCIDI R., QUINN T.C.

Gene typing of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Sex Transm Dis* 1992a ; **19** : 303-308.

82-GRAYSTON J.T., WANG S.P.

New knowledge of *Chlamydiae* and the diseases they cause. *J Infect Dis* 1975 ; **132** : 87-105.

83-GRAYSTON J.T., KUO C.C., CAMPBELL L.A., WANG S.P.

Chlamydia pneumoniae sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR.

Intern J Syst Bacteriol 1989 ; **39** : 88-90.

84-GRAYSTON J.T., CAMPBELL L.A., KUO C.C., THOM D.H., MORDHOST C.M., SAIKKU P.

A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR.

J Inf Dis 1990 ; **161** : 618-25.

85-GRIFFAIS R., THIBON M.

Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction.

Res Microbiol 1989 ; **140** : 139-141.

86-HACKSTADT T., TODD W.J., CALDWELL H.D.

Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of *Chlamydia*. *J Bacteriol* 1985 ; **161** : 25-31.

87-HACKSTADT T.

Identification and properties of chlamydial polypeptides that bind eucaryotic cell surface components. *J act* 1986 ; **16 B5** : 13-20.

88-HALBERSTAEDTER L., VON PROWAZEK S.

Zur Ätiologie des trachom. *Dtsch. Med Wochenschr* 1907 ; **33** : 1285-7.

89-HALBERSTAEDTER L., VON PROWAZEK S.

Üeber chlamydozoenbefunde bei blennorrhoe neonatorum non-gonorrhoea. *Berlin. Klin. Wochenschr.* 1909 ; **46** : 1839-1840.

90-HARTLEY J .C., KAYE S., STEVENSON S., BENNETT J., RIDGWAY G.

PCR Detection and Molecular Identification of *Chlamydiaceae* Species.

J Clin Microbiol 2001 ; **39** ; 9 : 3072-9.

91-HATCH T.P., VANCE D.W., AL-HOSSAINY E.

Attachment of *Chlamydia psittaci* to formaldehyde-fixed and unfixed L cells.

J Gen Microbiol 1981 ; **125** : 273-83.

92-HATCH T.P., ALLAN I., PEARCE J.H.

Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia sp.* *J Bacteriol* 1984 ; **157** : 13-20.

93-HATCH T.P., MICELI M., SILVERMAN J.A.

Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 1985 ; **162** : 938-42.

94-HATCH T.P., MICELI M., SILVERMAN J.A.

Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*.

J bacteriol 1986 ; **165** : 379-85.

95-HATCH T.P.

Structures of *Chlamydia*. In: Stephens RS, Byrne GL, Christiansen G, et al., ed. "Chlamydial Infection".

Proceedings of the 9th International symposium on human chlamydial infections. 1999 ; 241-50.

96-HATT C., WARD M.E., CLARKE I.N.

Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication.

Nucleic Acids Res 1988 ; **16** : 4053-4057.

97-HERRING A.J., ANDERSON I.E., INGLIS N.F., WILLIAMS H., MATHESON B.A., WEST C.P.

Restriction endonuclease analysis of DNA from two isolates of *Chlamydia psittaci* obtained from human abortions. *Brit Med J* 1987 ; **295** : 1239.

98-HUGUES E.; MOWATT J.; SPENCER J.E.H.

Endocervical *Chlamydia trachomatis* infection in Canadian adolescents.

CMAL, 1989 ; **140** ; 1: 297-301.

99-HYYPÄÄ T., LARSEN S.H., STAHLBERG T., TERHO P.

Analysis and detection of chlamydial DNA. *J Gen Microbiol* 1984 ; **130** : 3159-3164.

100-IKEHATA M., NUMAZAKI K., CHIBA S.

Analysis of *Chlamydia trachomatis* serovars in endocervical specimens derived from pregnant Japanese women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000 ; **27** ; 1 : 35-41.

101-JONES R.B.

Treatment of *Chlamydia trachomatis* infections of the urogenital tract. In : Proceedings of the Seventh International Symposium on Human chlamydial infections.

Ed. W. R. Bowie, H. D. Caldwell, R. P. Jones, P. A. Mardh, G. L. Ridgway, W. E. Stamm and M. E. Ward, Cambridge University Press 1990a, pp. 509-518.

102-JONES R.B., VAN DER POL B., JOHNSON R.B.

Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to trovafloxacin.

J Antimicrob Chemother 1997 ; **39** Suppl B : 63-5.

103-JOSEPH T.D., BOSE S.K.

Surface components of HeLa cells that inhibit cytoadherence of *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett* 1992 ; **91** : 177-80.

104-KAHANE S., METZER F., FRIEDMAN M.G.

Evidence that the novel microorganism "Z" belong to a new genus in the family *Chlamydiaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 1995 ; **126** : 203-8.

105-KAUL R., ROY K.L., WENMAN W.M.

Cloning, expression and primary structure of a *Chlamydia trachomatis* binding protein. *J Bacteriol* 1987 ; **169** : 5152-6.

106-KRAMER M.I., GORDON F.B.

Ultrastructural analysis of the effect of penicillin and chlortetracycline on the development of a genital tract *Chlamydia*. *Infect Immun* 1971 ; **3** : 333-41.

107-KUO C.C., CHEN H.H., WANG S.P., GRAYSTON J.T.

Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR.

J Clin Microbiol 1986 ; **24** : 1034-1037.

108-LA RUCHE G., FAYE-KETTE H., BANKOLE H. S., DABIS F.

Sexually transmitted infections and cervical neoplasia. *Int J of STD & AIDS* 2000 ; **11** : 67-70.

109-LADANY S., BLACK C.M., FARSHY C.E., OSSEWAARDE J.M., BARNES R.C.

Enzymes immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *J Clin Microbiol* 1989 ; **27** : 2778-83.

110-LAMPE M.F., SUCHLAND R.J., STAMM W.E.

Nucleotide sequence of the variable domains within the major outer membrane protein gene from serovariants of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1993 ; **61** : 213-219.

111-LAUDERDALE T.; LANDERS L.; THONEYCROFT I.; CHAPIN K.

Comparison of the PAGE 2 assay, Two amplification assay and Clearview EIA for detection of *Chlamydia trachomatis* in female endocervical and urines specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; **37** ; 7 : 2223-2229.

112-LEE C.K., MOULDER J.W.

Persistent infection of mouse fibroblastes (Mc Coy cells) with a Trachoma strain of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1981 ; **32** : 822-9.

113-LE FAOU A., BEBEAR C., RIOU J.

Diagnostic bactériologique des infections génitales. *Bull Soc Fr Microbiol* 1993 ; **8** ; 4 : 269-270.

114-LEPINAY A., ORFILA J., ANTEUNIS A., BOUTRY J.M., ORME-ROSSELLI L., ROBINEAUX R.

Etude en microscopie électronique du développement et de la morphologie de l'agent de l'ornithose dans les macrophages de souris. *Ann Inst Pasteur*, 1970 ; **119** : 22-31.

**115-LEPINAY A., ROBINEAUX R., ORFILA J., ORME-ROSSELLI L.,
BOUTRY J.M.**

Ultrastructure et cytochimie ultrastructurale des membranes de *Chlamydia psittaci*. *Arch Gesamte Virusforsch* 1971 ; **33** : 271-80.

116-LEVADITI J.C., RAVAUT P., LEPINE P., SCHOEN R.

Recherches expérimentales sur l'étiologie et la pathologie de la maladie de Nicolas-Favre. *Bull Acad Natl Méd (Paris)* 1931 ; **106** : 331-42.

117-LINDNER K.

Zur ätiologie der gonokokkenfreien urethritis. *Wien Klein Wochenschr* 1910 ; **8** : 283-284.

118-LEWIS V.J., THACKER W.L., MITCHEL S.H.

Demonstration of chlamydial endotoxin-like activity. *J Gen Microbiol* 1979 ; **114** : 215-6.

**119-LONGBOTTOM D., RUSSEL M., JONES G.E., LAINSON F.A.,
HERRING A.J.**

Identification of a multigen family coding for the 90 kDa proteins of the abortion subtype of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol Lett* 1996 ; **142** : 277-81.

120-LOUIS C., NICOLAS G., EB F., LEFEBVRE J.F., ORFILA J.
Modification of the envelope of *Chlamydia psittaci* during its developmental cycle: freeze fracture study of complementary replicas. *J Bacteriol* 1980 ; **141** : 868-75.

121-MAHONY J. B., CHERNESKY M. A.

Effect of swab and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985 ; **22** : 865-867.

122-MAHONY J. B., LUINSTR A K. E., SELLORS J. W., CHERNESKY M. A. Comparison of polymerase chain reaction (PCR), enzyme immunoassay and culture for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in symptomatic and asymptomatic males and females, 1990 p. 487-490. In W. R. Bowie et al. (ed.), Chlamydial infections. Cambridge University Press, Cambridge.

123-MAHONY J. B., LUINSTR A K. E., SELLORS J. W., JANG D., CHERNESKY M. A.

Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void-urine from asymptomatic and symptomatic men. *J. Clin. Microbiol.* 1992 ; **30** ; 9 : 2241-2245.

124-MAHONY J. B.

Sensibilité comparée Amplicor TM *Chlamydia trachomatis* / Culture cellulaire ou IFD. Analyses de prélèvements endocervicaux chez 770 femmes. *J. Clin. Microbiol.* 1994 ; **32** : 2490-2493.

125-MAJEED M., GUSTAFSSON M., KIHLSSTROM E., STENDAHL O.

Roles of Ca⁺⁺ and F-actin in intracellular aggregation of *Chlamydia trachomatis* in eucaryotic cells. *Infect Immun* 1993 ; **61** : 1406-14.

126-MANIRE G.P., GALASSO G.J.

Persistent infection of Hela cells with meningopneumonitis virus. *J Immunol* 1959 ; **88** : 529-33.

127-MARDH P.A., PAAVONEN J., PUOLAKKAINEN M.

Susceptibility of *Chlamydiae* to different antimicrobials.

In : *Chlamydia*, ed. Plenum Medical Book Company, New York 1989 ; pp. 107-116.

128-MARTY N.

Electrophorèse en champ pulse : typage moléculaire utilisé en routine dans le suivi des infections nosocomiales. *Option/BIO* 1997 ; **183** : 13-14.

129-MATSUMOTO A., MANIRE G.P.

Electron microscopic observations on the effect of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 1970 ; **101** : 218-35.

130-MATSUMOTO A.

Recent progress of electron microscopy and its development in future: from a study of the obligate intracellular parasites, *Chlamydia* organisms.
J. Electron Microsc 1979 ; **28** Suppl 1 : S57-64.

131-MATSUMOTO A.

Surface projections of *Chlamydia* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. *J Bacteriol* 1982 ; **151** : 1040-2.

132-McCOMB D. E., NICHOLS R. L., SEMINE D. Z., EVRARD J. R., ALPERT S. et al.

Chlamydia trachomatis in women : antibody in cervical secretions as a possible indicator of genital infection. *J. Infect. Dis.* 1979 ; **139** : 628-633.

133-Mc DONALD A.B.

Antigens of *Chlamydia trachomatis*. *Rev Infect Dis* 1985 ; **7** : 731-6.

134-MEYER K.F.

The host spectrum of psittacosis-lymphogranuloma venereum (PL) agents.
Am J Ophthalmol 1967 ; **63** : 1225-46.

135-MIYASHITA N., NIKI Y., KISHIMOTO T., NAKAJIMA M., MATSUSHIMA T.

In vitro and in vivo activities of AM-1155, a new fluoroquinolone, against *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 ; **41** : 1331-4.

136-MORRE S.A., OSSEWAARDE J.M., LAN J., VAN DORNUM G.J.J., WALBOOMERS J.M.M., McLAREN D.M.

Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G and J as confirmed by OMP-1 nucleotide sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1998 ; **36** : 345-51.

137-MORRE S. A., ROZENDAAL L., VAN VALKENGOED I. G., BOEKE A. J., VAN VOORST VADER P. C. et al.

Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection : an association with clinical manifestations? *J Clin Microbiol* 2000 ; **38** ; 6 : 2292-2296.

138-MOULDER J.W.

The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Ann Rev Microbiol* 1966 ; **20** : 107-130.

139-MOULDER J.W., LEVY N.J., SCHULMAN L.P.

Persistent infection of mouse fibroblastes (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect Immun* 1980 ; **30** : 874-83.

140-MOULDER J.W., ZEICHNER S.L., LEVY N.J.

Association between resistance to superinfection and patterns of surface protein labeling in mouse fibroblastes (L cells) persistently infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* 1982 ; **35** : 834-9.

141-MOULDER J.W., HATCH T.P., KUO C.C., SCHACHTER J., STORZ J.

Genus *Chlamydia* . In: . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. Krieg, N. R. ed. *Baltimore* : Williams and Wilkins 1984 ; PP. 729-739.

142-MOULDER J.W.

Interaction of *Chlamydia* and host cells in vitro. *Microbio Rev* 1991 ; **55** : 143-90.

143-NANO F.E., CALDWELL H.D.

Expression of the chlamydial genus-specific lipopolysaccharide epitope in *Escherichia coli*. *Science* 1985 ; **228** : 742-4.

144-NEWHALL W.J.V.

Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1987 ; **55** : 162-8 .

145-NUMAZAKI K., IKEHATA M., CHIBA S., SUZUKI K., HASHIMOTO N.

Unclassified serovars of *Chlamydia trachomatis* isolated from Japanese infants. *Clin Microbiol Infect* 1998 ; **4** : 519-23.

146-NURMINEN M., RIETSCHER E.T., BRADE H.

Chemical characterization of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1985 ; **48** : 573-5.

147-ORFILA J., EB F.

Infections humaines à *Chlamydia psittaci*.
Encyclopédie Médico-Chirurgicale 8075 A 10,9,1989 ; p 5.

148-OSTERGAARD L., BIRKELUND S., CHRISTIANSEN G.

Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*.

J Clin Microbiol 1990 ; **28** : 1254-1260.

**149-OSTERGAARD L., TRAUlsen J., BIRKELUND S.,
CHRISTIANSEN G.**

Evaluation of urogenital *Chlamydia trachomatis* infections by cell culture and the polymerase chain reaction using a closed system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991 ; **10** : 1057-1061.

150-PAGE L. A.

Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis lymphogranuloma venereum trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns 1945. *Intern J System Bacteriol* 1966 ; **16** : 223-52.

151-PAGE L.A.

Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns. *Intern J System Bacteriol* 1968; **18** : 51-66.

152-PALMER L., FALKOW S.

A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986 ; **16** : 52-62.

153-PATEL H. C.; GOH B. T.; VISWALINGAM N. D.; TREHARNE J. D.

Interpretation of *Chlamydia trachomatis* antibody response in chlamydial oculogenital infection. *Genitourin. Med.* 1995 ; **71** : 94-97.

154-PEELING R.W., BAILEY R.L., CONWAY D.J., HOLLAND D.J., CAMPBELL M.J., JALLOW O.

Antibody reponse to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma. *J Infect Dis* 1998 ; **177** : 256-59.

155-PETERSON B., BIRKELUND S., HOLM A., OSTERGAARD S., CHRISTIANSEN G.

The 18-kilodalton *Chlamydia trachomatis* histone H1-like protein (Hc1) contains a potential N-terminal dimerization site and a C terminal nucleic acid binding domain. *J Bacteriol* 1996 ; **178** : 994-1002.

156-PETERSON B., ANDERSON A., LEITNER T., OLSVIK O., UHLEN M., STOREY C.

Evolutionary relationship among members of the genus *Chlamydia* based on 16S ribosomal DNA analysis. *J Bacteriol* 1997 ; **179** : 4195-205.

157-PETERSON E.M., DE LA MAZA L.M.

Restriction endonuclease analysis of DNA from *Chlamydia trachomatis* biovars. *J Clin Microbiol* 1988 ; **26** : 625-629.

158-PETERSON E.M., MARKOFF B.R., SCHACHTER J., DE LA MAZA L.

The 7.5 kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of the organism. *Plasmid* 1990b ; **23** : 144-8.

159-POLLARD M., SHARON N.

Induction of prolonged latency in psittacosis infected cells by aminopterin. *Proceedings. Exp Biol Med* 1963 ; **112** : 51-4.

160-POOLE E., LAMONT I.

Chlamydia trachomatis serovar differentiation by direct sequence analysis of the variable segment 4 region of the major outer membrane protein gene.

Infect Immun 1992 ; **60** : 1089-1094.

161-POPOV V., EB F., LEFEBVRE J.F., ORFILA J., VIRON A.

Morphological and cytochemical study of *Chlamydia* with EDTA regressive technique and Gautier staining in ultrathin frozen sections of infected cell cultures: a comparison with embedded material. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 1978 ; **129B** : 313-37.

162-PUDJIATMOK O., FUKUSHI H., OCHIAI Y., YAMAGUCHI T., HIRAI K.

Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1997 ; **47** : 425-31.

163-PUY H., FUENTES V., EB F., ORFILA J.

Caractères biochimiques et structure antigénique des *Chlamydia*. *Ann Biol Clin* 1989 ; **47** : 485-491.

164-RADOUANI F.; LEFEBVRE J.F.; TAKOURT B.; EB F ; IBRAHIMY S. ; BENSLIMANE A.

Détection et typage moléculaire de *Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements endocervicaux et biopsiques des femmes hypofertiles. X^{ème} Conférence Internationale sur le SIDA et les MST en Afrique.

165-RAGNAUD J.M., DUPON M., ECHINARD E., LACUT J.Y., AUBERTIN J.

Aspects actuels des infections à *Chlamydia psittaci*: à propos de 32 observations. *Méd Mal Inf* 1985 ; **15** : 706-13.

166-RAKE G., EATON M.D., SHAFFER M.F.

Similarities and possible relationships among viruses of psittacosis, meningopneumonitis, and lymphogranuloma venereum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941 ; **48** : 528-531.

167-RAKE G., SCHAFFER M., THYGERSON P.

Relationship of agents of trachoma and inclusion conjunctivitis to those of lymphogranuloma-psittacosis group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1942 ; **49** : 545-547.

168-RATTI G. ; MORONI A. ; CEVENINI R.

Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in patients with non gonococcal urethritis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 1991 ; **199** : 564-568.

169-RAULSTON J.E., DAVIS C.H., SCHMIEL D.H., MORGAN M.W., WYRICK P.B.

Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp 70 family of proteins. *J Biol Chem*, 1993 ; **268** : 23139-47.

170-RIDGWAY G. L., TAYLOR-ROBISON D.

Current problems in Microbiology : *Chlamydia* infections : which laboratory test? *J Clin Pathol* 1991 ; **44** : 1-5.

171-RODRIGUEZ P., VEKRIS A., DE BARBEYRAC B., DUTILH B., BONNET J., BEBEAR C.

Typing of *Chlamydia trachomatis* by restriction enzyme analysis of the amplified major outer membrane protein gene. *J Clin Microbiol* 1991 ; **29** : 1132-1136.

172-RODRIGUEZ P., DE BARBEYRAC B., PERSSON K., DUTILH B., BEBEAR C.

Evaluation of molecular typing for epidemiological study of *Chlamydia trachomatis* genital infections. *J Clin Microbiol* 1993 ; **31** ; 8 : 2238-2240.

173-RODRIGUEZ P., DE BARBEYRAC B., RENAUDIN H., BEBEAR C.

Antibiotigramme des *Chlamydia* et des mycoplasmes. *Rev Fr Lab* 1995 ; **277** : 75-80.

174-RONALD F. L.; ELISABERTH A. H.; PHILIP E. H.; JOHN M. D.; VIKASH M.; CATHY A. L.; DAVID T. R.

A comparison of use of Papanicolaou Stained Cervical Cytological Smears with Gram-stained Vaginal smears for the diagnosis of bacterial vaginosis in early pregnancy. *Int. J. of STD and AIDS* 1999 ; **10** : 93-97.

175-SACKS D.L., Mc DONALD A.B.

Isolation of a type specific antigen from *Chlamydia trachomatis* by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol* 1979 ; **122** : 136-9.

176-SALARI S.H., WARD M.E.

Polypeptide composition of *Chlamydia trachomatis*. *J Gen Microbiol*, 1981 ; **123** : 197-207.

177-SANON S., GERSHY-DAMET G.M., M'BOUP S., KOFFI K., SORO B.N., LECORRE M., FAYE H., DOSSO M.

Prévalence de *Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements génitaux à Abidjan. *Bull Soc Pathol Exot* 1992 ; **85** : 209-211.

178-SAROV I., BECKER Y.

Trachoma agent DNA. *J Mol Biol* 1969 ; **42** : 581-589.

179-SAYADA C., DENAMUR E., ORFILA J., CATALAN F., ELION J.

Rapid genotyping of the *Chlamydia* major outer membrane protein by the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol* 1991 ; **83** : 73-8.

180-SAYADA C., DENAMUR E., XERRI B., ORFILA J., CATALAN F., ELION J.

Epidémiologie de *Chlamydia trachomatis* par l'analyse du gène de la protéine majeure de membrane externe. *Path Biol* 1992b ; **40** : 583-589.

181-SCHACHTER J., OSTLER H.B., MEYER K.F.

Human infection with agent of feline pneumonitis. *Lancet* 1969 ; **1** : 1063-5.

182-SCHACHTER J.

The intracellular life of *Chlamydia*. *Curr. Top Microbiol Immunol* 1988 ; **138** : 109-40.

183-SCHECHTER E. M.

Synthesis of nucleic acid and protein in L cells infected with the agent of meningopneumonitis. *J Bacteriol* 1966 ; **91** : 2069-80.

184-SCHRAMM N., WYRICK P.B.

Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. *Infect Immun* 1995 ; **63** : 324-32.

185-SCHRAMM N., BAGNELL C.R., WYRICK P.B.

Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH6 withing HEC-IB cells. *Infect Immun* 1996 ; **64** : 1208-14.

186-SCIEUX C., BIANCHI A., CHAPPEY B., VASSIAS I., PEROL Y.

In vitro activity of azithromycin against *Chlamydia trachomatis*. *J Antimicrob Chemother* 1990 ; **25** Suppl A : 7-10.

187-SCIEUX C.

Urétrites masculines à *Chlamydia trachomatis* : critiques des examens biologiques. *Rev. Eur. Dermatol. MST* 1991 ; **3**, 6 : 279-282.

188-SCIEUX C., GRIMONT F., REGNAULD B., GRIMONT P.A.D.

DNA fingerprinting of *Chlamydia trachomatis* by use of ribosomal RNA, oligonucleotide and randomly cloned DNA probes. *Res Microbiol* 1992 ; **143** : 755-765.

189-SELLORS J.

Rapid on site diagnostic of chlamydial urethritis in men by detection of antigens in urethral swabs and urine. *J. Clin. Microbiol.* 1991 ; **29**, 2 : 407-409.

190-SHEMER-AUNI Y., KOL R., SAROV I.

Tryptophan reversal of recombinant human gamma-interferon inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth. *Curr Microbiol* 1987 ; **16** : 9-13.

191-SONJA G., JOHN A. N., LUTHER E. L. M., LINDA D., STEVEN W.

Sensitivity and specificity of Papanicolaou-Stained cervical smear in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *Acta. Cyst. J. Clin. Cytopath.* 1985 ; **29** ; 5 : 671-675.

192-SRIPRAKASH K.S., MACAVOY E.S.

Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1987 ; **18** : 205-214.

193-STEPHENS R.S., TAM M.R., KUO C.C., NOWINSKI R.C.

Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol* 1982 ; **128** : 1083-9.

194-STEPHENS R.S., KUO C.C., NEWPORT G., AGABIAN N.

Molecular cloning and expression of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein antigens in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985 ; **47** : 713-718.

195-STEPHENS R.S., SANCHEZ-PESCADOR R., WAGAR E.A., INOUE C., URDEA M.S.

Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 1987 ; **169** : 3879-3885.

196-STEPHENS R.S., WAGAR E.A., EDMAN U.

Developmental regulation of tandem promoters for the major outer membrane protein gene of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 1988a ; **170** : 744-750.

197-STOREY C., LUSHER M., YATES P., RICHMOND S.

Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Microbiol* 1993 ; **139** : 2621-6.

198-STORZ J., PAGE L.A.

Taxonomy of the *Chlamydiae* : reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, family *Chlamydiaceae* in a separate order, *Chlamydiales* ord. nov. *Int J System Bacteriol* 1971 ; **21** : 332-4.

199-STORZ J., BAGHIAN A., KOUSOULAS K.G.

Advances in detection of differentiation of *Chlamydiae* from animals.

In: Orfila J, Byrne GI, Chernesky MA. "Chlamydial infections". Proceedings of the Eighth International Symposium on Human Chlamydial Infections. 1994 ; 563-73.

200-STUART E.S., TIRRELLI S.M., Mc DONALD A.B.

Characterization of an antigen secreted by *Chlamydia*-infected cell culture.

J Immuno 1987 ; **61** : 527-33.

201-STURM-RAMIREZ K., BRUMBLAY H., DIOP K., GUEYE-NDIAYE A., SANKALE J-L. et al.

Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk women in Senegal, West Africa. *J Clin Microbiol* 2000 ; **38** ; 1 : 138-145.

202-SU H., WATKINS N.G., ZHANG Y.X., CALDWELL H.D.

Chlamydia trachomatis host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 1990 ; **58** : 1017-25.

203-SWANSSON A.F., KUO C.C.

Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to Hela cells. *Infect Immun* 1994 ; **62** : 24-8.

204-TANIKAWA M.; HARADA T.; KATAGIRI C.; TERAOKAWA N.

Chlamydia trachomatis antibody titres by enzyme-linked immunosorbent assay are useful in predicting severity of adnexal adhesion. *Hum reproduct* 1996 ; **11** ; 11 : 2418-2421.

205-TAYLOR-ROBINSON D.

The value of the non-culture techniques for detection of *Chlamydia trachomatis* infections : making the best of a bad job. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992 ; **11** : 499-503.

206-TAYLOR-ROBINSON D.

Tests for infection with *Chlamydia trachomatis*. *Int. J. STD AIDS* 1996 ; **7** : 19-26.

207-THEJLS H.; RAHM V. A.; GRARPE J.

Diagnostic efficacy of chlamydial antibodies in cervical secretions from pregnant women and adolescents girls. *Genitourin Med.* 1995 ; **71** : 370-374.

208-THIERRY R. C.; WURTZ A.

Immunoglobulines A dans le vagin et étude de leur spécificité. *Pathol Biol* 1975 ; **23** ; 5 : 367-370.

209-THOMAS B. J.; PIERPOINT T.; TAYLOR-ROBINSON D.; RENTON A.

Quantification of *Chlamydia trachomatis* in cervical and urine specimen from women attending a genitourinary medicine clinic : implication for screening strategies. *Int. J. STD AIDS* 1999 ; **9** : 448-451.

210-TIMMS P., JACKSON M., GLASSICK T.

Phylogenetic diversity of chlamydial strains (*C. Pecorum* and *C. Pneumoniae*) infecting koalas.

In: A Stary, ed. *Proceedings third meeting of the European Society for Chlamydia research*. 1996 ; 119.

211-TRUANT A.L.

Persistent infection of Hela 229 cells with *Chlamydia trachomatis*.

Curr Microbiol 1981 ; 5 : 105-8.

212-VAN DYCK E., SAMB N., DIENG SARR A., VAN DE VELDEN L., MORAN J et al.

Accuracy of two enzyme immuno assays and cell culture in the detection of *Chlamydia trachomatis* in low and high risk populations in Sénégal.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992 ; 11 : 527-534.

213-VEENA S. ; MADAN M. G.; SATYANARAYANA L.; PARASHARI A.; ASHAK S.; CHATTOPADHYA D.; SODHANI P.

Association between Reproductive Tract Infection and Cervical Inflammatory Epithelial Changes. *Sex. Transm. Dis.* 1995 ; 22 ; 1 : 25-30.

214-VRETOU E., GOSWANI P.C., BOSE S.K.

Adherence of multiple serovars of *Chlamydia trachomatis* to a common receptor on Hela and Mc Coy cells is mediated by thermolabile protein(s).

J Gen Microbiol 1989 ; 135 : 3229-37.

215-WANG S.P., GRAYSTON J.T.

Immunologic relationships between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol* 1970 ; 70 : 367-74.

216-WANG S.P., GRAYSTON J.T.

Classification of TRIC and related strains with microimmunofluorescence.

In: RL Nichols, ed. *Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents*. Excerpta Medica. Amsterdam: 1971. p. 305-21.

217-WANG S.P., GRAYSTON J.T.

Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, L2a. *J Infect Dis* 1991 ; **163** : 403-5.

218-WARD M.E., SALARI.

Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: modulation by cyclic nucleotides, prostaglandins and calcium.

J Gen Microbiol 1982 ; **128** : 639-50.

219-WARD M.E.

Chlamydial classification, development and structure. *Brit Med Bull* 1983 ; **39** : 109-15.

220-WATSON M.W., AL-MAHDAWIS S., LAMB DEN P.R., CLARKE I.N.

The nucleotide sequence of the 60 KDa cystein rich outer membrane protein of *Chlamydia pneumoniae* strain IOL-207. *NAR* 1990 ; **18** : 5299.

221-WEISBURG W. G., HATCH T. P., WOESE C. R.

Eubacterial origin of Chlamydiae. *J. Bacteriol.*, 1986 ; **167** : 570-574.

222-WEISS S.M., HAMMERSCHLAG M.R.

Are heart attacks infectious? A critical look at the link between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Bull Inst Pasteur* 1997 ; **95** : 107-13.

223-WELSH L.E., GAYDOS C.A., QUINN T.C.

In vitro evaluation of activities of azithromycine and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*.

Antimicro Agents Chemother 1992 ; **36** : 291-4.

224-WENMAN W.M., MEUSER R.U.

Chlamydia trachomatis elementary bodies possess proteins which bind to eucaryotic cell membranes. *J Bacteriol* 1986 ; **165** : 602-7.

225-WHITTHUM HUDSON.

New strategies for vaccine development.

In "Stary A, ed. Proceedings third Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research". 1996. p. 163-6.

226-WITKIN S. S., BONGIOVANNI A. M., INGHIS S. R.

Detection of endocervical anti-*Chlamydia trachomatis* immunoglobulin A in pregnant women by a rapid 6-minute enzyme linked immunosorbent assay : comparison with PCR and chlamydial antigen detection methods. *J. Clin. Microbiol.* 1997 ; **7** : 1781-1783.

227-YOSHO S.

Cytomorphologic and immunocytochemical studies of *Chlamydia* infections in cervical smears. *Acta. Cyst. J. Cytopath.* 1985 ; **29** ; 5 : 683-691.

228-YUAN Y., ZHANG Y.X., WATKINS N.G., CALDWELL H.D.

Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun* 1989 ; **57** : 1040-9.

229-YUAN Y., LYNG K., ZHANG Y.X., ROCKEY D.D., MORRISSON R.P.

Monoclonal antibodies define genus-specific, species-specific and cross-reactive epitopes of the 60-kilodalton heat shock protein (hsp60). *Infect Immun*, 1992 ; **60** : 2288-96.

230-ZHANG J.P., STEPHENS R.S.

Mechanism of *C trachomatis* attachment to eukaryotic host cells.
Cell 1992 ; **69** : 961-969.

231-ZHANG Y.X., STEWART S., JOSEPH T., TAYLOR H.R., CALDWELL H.D.

Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* 1987 ; **138** : 575-81.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS CONCERNANT LA PRESENTE THESE

1-ARTICLES PARUS

- LA RUCHE G., FAYE-KETTE H., **BANKOLE H. S.**, DABIS F.

Sexually transmitted infections and cervical neoplasia. *Int J of STD & AIDS* 2000 ; **11** : 67-70.

- **BANKOLE H.**, FAYE-KETTE H., LARUCHE G., DABIS F., DOSSO M., WELFENS-EKRA C.

Etude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomati* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan. *Bull. Soc. Path. Exot* 2001; **94**, 3 : 235-238.

- FAYE-KETTE H., ALLANGBA A., **BANKOLE H.**, KOUASSI-M'BENGUE A., BOUZID S., DOSSO M.

Evaluation du premier jet d'urines dans le diagnostic de l'infection à *Chlamydia trachomatis* chez des patientes symptomatiques à Abidjan. *Bio Africa* (sous presse)

2- ARTICLES EN COURS DE PARUTION

- **BANKOLE H.**, FAYE-KETTE H., ADO-MENSAH I., KONAN K., M'BENGUE-KOUASSI A., ACHO Y. B., BOUZID S., DOSSO M.

Diagnostic de l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis* par la coloration de Papanicolaou dans les sécrétions génitales de la femme à Abidjan-Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* (soumis)

■ **BANKOLE H., FAYE-KETTE H., WASSOUMBOU S., KAKOU-N'DOUBA A., KOUASSI-M'BENGUE A., BOUZID S., DOSSO M.**

Detection des immunoglobulines A endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* chez les femmes présentant des leucorrhées à Abidjan-Côte d'Ivoire.

Bull Soc Pathol Exot (soumis)

3- COMMUNICATIONS ORALES

■ **BANKOLE H¹., FAYE-KETTE H¹., LARUCHE G²., DABIS F²., DOSSO M¹.**

Essai d'isolement de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire en zone tropicale. X^{ème} Conférence Internationale Sur le SIDA et les MST (CISMA) en Afrique. Abidjan les 7-8-9-10-11 décembre 1997.

PRESENTATIONS ORALES / ORAL PRESENTATIONS

results were positive checking after amplifying the HLA-DQ α locus. Therefore the sensitivity of our nested PCR is globally estimated at 95.7. The PCR algorithm for HIV-1 detection build in our context started in most cases by using the couple of primers H1pol and gag (98.4) followed by pol primers pairs for all the discordant PCR results.

Conclusion: This study describes the evaluation of diagnostic HIV-1 DNA PCR on a set of samples selected among HIV-1 infected pregnant women. The quality control of our study is carried out by the laboratory of Virology of Necker Enfants Malades Hospital (Paris). The test PCR algorithm obtained is presently applied on DNA samples of babies born to these HIV-1 infected mothers according to the choice of primers found to be optimal in their mothers.

A.184 PCR to Discriminate Between HIV-1 and HIV-2 in Serologically Double Reactive Samples

L. Walther¹, S. Anderson¹, F. Dias², G. Biberfeld¹. ¹Swedish Institute for Infectious Disease Control and Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; ²Laboratorio Nacional de Saude Publica (LNSP), Bissau, Guinea-Bissau.

Introduction: Guinea-Bissau is an HIV-2 endemic country with a rapidly increasing HIV-1 prevalence. The rate of dual reactivity to HIV-1 and HIV-2 in serological tests is increasing either due to dual infection or due to cross-reactivity between HIV-1 and HIV-2. It is important to resolve the true nature of dual seroreactivity as it has consequences both in seroepidemiological and clinical studies.

Objective: To evaluate, by use of highly specific and sensitive nested HIV-1 and HIV-2 PCR assays the specificity of antibody assays designed to discriminate between HIV-1 and HIV-2 and used for routine diagnostics in Guinea-Bissau.

Methods: 31 samples dually reactive on the Multispot antibody assay were tested by Immunocomb (anti-HIV 1 + 2), HIV-1 and HIV-2 Western blot (WB) assays and by nested PCR using HIV-1 vif and HIV-2 LTR primer pairs (1,2). Samples negative in PCR were retested by HIV-1 and HIV-2 env primer pairs (1,2). 30 HIV-1 and 30 HIV-2 antibody positive samples were tested with all the primer pairs to investigate the sensitivity and specificity of the PCR.

Results: Of 31 samples dually reactive on the Multispot assay 26 were also dually reactive on Immunocomb. 30 of 31 Multispot-dually-reactive samples were dually reactive on WB showing reactivity with two HIV-1 and two HIV-2 env bands. 24 of 31 samples (77%) dually reactive on multispot were PCR positive for both HIV-1 and HIV-2. The table shows the reactivity on Immunocomb compared to the PCR results. 23 of 26 (88%) samples with dual seroreactivity on Immunocomb were dually PCR-positive. One sample, dually-reactive by PCR and Multispot had strong HIV-1 reactivity but indeterminate HIV-2 reactivity on Immunocomb and WB.

	Immunocomb		
	HIV-1 (n=1)	HIV-2 (n=4)	double (n=26)
HIV-1 (n=1)	0	0	1
HIV-2 (n=6)	0	4	2
double (n=24)	1	0	23

All 30 HIV-2 antibody positive samples were positive in the HIV-2 PCR assay and negative in the HIV-1 PCR assay. The contrary was true for the HIV-1 PCR assay. The respective

PCR assay was shown to detect one single copy of HIV provirus.

Conclusions: The HIV-2 as well as the HIV-1 PCR assay showed a high sensitivity and type-specificity. The concordance between dual seroreactivity and dual PCR-positivity was better for Immunocomb than for Multispot but the difference was not significant. It is important to evaluate the HIV-1 AND HIV-2 discriminatory capacity of antibody assays by comparison with PCR.

References: 1) Grandkvist et al. AIDS 1991, 5: 575-578. 2) Grandkvist et al. J. AIDS 1992, 5: 286-293.

Session 27

Diagnostic biologique des MST (II) Biological diagnosis of STD (II)

A.185 Essai d'isolement de Chlamydia trachomatis par culture cellulaire en Zone tropicale

Bankolé H¹, Faye-Kette H¹, Laruche G², Dabis F², Dosso M¹. ¹Institut Pasteur de Côte d'Ivoire; ²Université Bordeaux II.

Objectif: Déterminer la prévalence des infections à *C. trachomatis* par culture cellulaire et recenser les difficultés inhérentes à l'utilisation d'une telle technique en zone tropicale.

Matériel et Méthodes: L'isolement de *C. trachomatis* par culture cellulaire a été réalisé au cours d'une étude transversale concernant 2 000 femmes non enceintes et consultant pour diverses affections gynécologiques. Des prélèvements d'endocol réalisés avec un écouvillon spécial (type bactopick) ont été conservés dans du 2SP à -70°C jusqu'à inoculation.

Après inoculation des prélèvements, l'infection des cellules Mac Coy est réalisée par centrifugation à 2 500 trs/mn à 37°C pendant 1 heure. Après traitement au cycloheximide, les cellules inoculées sont incubées à 37°C sous 6,5% de CO₂. Les inclusions cytoplasmiques signant l'infection par *C. trachomatis* sont révélées après 48 heures d'incubation par immunofluorescence directe à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-*C. trachomatis*.

Résultats: La mise en place de la technique est effective. La prévalence de l'infection chlamydienne obtenue par cette méthode est de 11,4% chez les femmes non enceintes. Les difficultés rencontrées sont essentiellement liées à la perte du pouvoir d'adhérence de cellules par appauvrissement du milieu d'entretien en sérum de veau foetal ou par rupture de la chaîne de froid et aux contaminations répétées qui ont justifié l'adjonction de Vancomycine dans le milieu de EAGLE en plus de la gentamycine classiquement recommandée. Par rapport aux cellules inoculées, dans 15% des cas il a été observé une lyse du tapis cellulaire liée soit à la présence de sang dans les échantillons, soit à une cause qui reste à déterminer.

Conclusion: En dépit des problèmes sus-cités, l'isolement de *C. trachomatis* par culture cellulaire est possible dans un laboratoire en zone tropicale.

Letters to the Editor

Sexually transmitted infections and cervical neoplasia

Sir: The contribution of 2 sexually transmitted viruses, namely human papillomavirus (HPV) and HIV, in the development of cervical neoplasia has been clearly established worldwide¹. The actual role of a third sexually transmitted virus, herpes simplex type 2, remains unclear^{2,3}. Very few studies have in fact shown an association between cervical dysplasia-neoplasia and bacterial or parasitic sexually transmitted infections (STIs)⁴. The interrelationship between sexual behaviour, HPV, HIV and other STIs makes it difficult to pull out 'classical' STIs as independent risk factors for cervical neoplasia.

Recently Takac *et al.*⁵ compared the frequency of *Chlamydia trachomatis* infection in women with and without cervical dysplasia, showing no association between chlamydial infection and dysplasia. They conclude that chlamydial infection seems not to interfere with the development or the promotion of cervical dysplasia. We would like to share our experience in this field from a study with both a cross-sectional and a prospective component, conducted in African women with high HIV and STI prevalences.

Between 1995 and 1996, 2037 women underwent both cervical and STI screenings in 3 outpatient gynaecology clinics in Abidjan, Côte d'Ivoire⁶. In this sample, the prevalence of cervical dysplasia-neoplasia was 11.8%; it was 7.8% for low-grade squamous intraepithelial lesions (SILs), 3.1% for high-grade SILs and 0.9% for invasive carcinomas (ICs). Table 1 shows that HPV and HIV were the only infections associated with cervical dysplasia-

neoplasia in univariate analysis, and HPV infection played the main role; HIV-1 was associated with SILs and HIV-2 with ICs. Bacterial and parasitic STIs were not associated with SILs or ICs, even after adjustment for potential confounders as parity, age at first intercourse and number of sexual partners. Low-grade SILs were less frequent in women with candidiasis ($P=0.022$), but this relation disappeared when taking into account HPV and HIV results.

Of the women with low-grade SILs, 94 were followed up to assess the short-term evolution of these lesions⁷. A median of 5 months after the initial smear, HIV-1 and HPV were the only infections significantly associated with the persistence of SILs in univariate analysis, and HIV-1 infection played the main role. Persistence of SILs was slightly more frequent in women with chlamydial infection at enrolment ($P=0.059$), but this relation disappeared in multivariate analysis. These results reinforce the marginal contribution, if any, of classical and curable STIs in the occurrence and progression of cervical dysplasia-neoplasia^{5,8,9}.

G la Ruche MD¹, H Faye-Ketté MD²,
H S Bankolé MD² and F Dabis MD PhD³
¹National AIDS Control Program, Abidjan,
²Institut Pasteur de Cocody, Abidjan,
Côte d'Ivoire and
³Unité INSERM 330, Université Victor Segalen,
Bordeaux 2, Bordeaux, France

References

- Mandelblatt JS, Kanetsky P, Eggert L, Gold K. Is HIV infection a cofactor for cervical squamous cell neoplasia? *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:97-106

Table 1. Risk of prevalent squamous intraepithelial lesions (SILs) and invasive carcinomas (ICs), and risk of persistence of low-grade SILs in gynaecological patients according to microbiological findings at enrolment, Abidjan: univariate analyses

Findings	Prevalence study			Prospective study
	Prevalence	Low-grade SILs RR (95% CI)	High-grade SILs RR (95% CI)	ICs RR (95% CI)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	3.5%	1.5 (0.7, 3.0)	1.1 (0.3, 4.5)	0.0 NA
<i>Chlamydia trachomatis</i> *	11.0%	1.3 (0.8, 2.0)	1.4 (0.6, 3.0)	3.1 (0.8, 11.7)
<i>Trichomonas vaginalis</i> [†]	3.0%	0.4 (0.1, 1.7)	1.6 (0.5, 5.0)	1.9 (0.3, 13.8)
Yeast cells [‡]	9.5%	0.4 (0.2, 0.9)	1.1 (0.5, 2.5)	0.0 NA
Clue cells [‡]	46.7%	1.2 (0.9, 1.6)	1.3 (0.8, 2.1)	0.5 (0.2, 1.3)
HPV DNA positivity [‡]	31.7%	4.9 (2.9, 8.3)	17.4 (8.0, 38.7)	13.3 (2.7, 73.6)
Syphilis seropositivity [§]	4.9%	0.6 (0.3, 1.5)	0.3 (0.1, 2.2)	2.4 (0.6, 10.5)
HIV-1 seropositivity	19.5%	3.0 (2.3, 4.1)	4.7 (2.9, 7.5)	0.7 (0.2, 3.1)
HIV-2 seropositivity	1.8%	1.5 (0.5, 4.5)	0.0 NA	6.4 (1.5, 27.1)

*Culture from endocervical specimens. [†]Gram stain from vaginal smears. [‡]By polymerase chain reaction. [§]Both Venereal Disease Research Laboratory and *Treponema pallidum* haemagglutination positive results. RR=relative risk; CI=confidence interval; HPV=human papillomavirus; NA=not applicable

- 2 Jones C. Cervical cancer: is herpes simplex virus type II a cofactor? *Clin Microbiol Rev* 1995;8:549-56
- 3 Munoz N, Kato I, Bosch FX, et al. Cervical cancer and herpes simplex virus type 2: case-control studies in Spain and Colombia, with special reference to immunoglobulin-G subclasses. *Int J Cancer* 1995;60:438-42
- 4 Zhang ZF, Graham S, Yu SZ, et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. *Ann Epidemiol* 1995;5:323-32
- 5 Takac I, Gorisek B. *Chlamydia trachomatis* infection in women with and without cervical intraepithelial neoplasia. *Int J STD AIDS* 1999;10:331-3
- 6 La Ruche G, Ramon R, Mensah-Ado I, et al. Squamous intraepithelial lesions of the cervix, invasive cervical carcinoma, and immunosuppression induced by human immunodeficiency virus in Africa. *Cancer* 1998;82:2401-8
- 7 La Ruche G, Leroy V, Mensah-Ado I, et al. Short-term follow up of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV and human papillomavirus infections in Africa. *Int J STD AIDS* 1999;10:363-8
- 8 Jha PK, Beral V, Peto J, et al. Antibodies to human papillomavirus and to other genital infectious agents and invasive cervical cancer risk. *Lancet* 1993;341:1116-18
- 9 Schwebke JR, Zajackowski ME. Effect of concurrent lower genital tract infections on cervical cancer screening. *Genitourin Med* 1997;73:383-6

Update on the experimental human model for chancroid infection

Sir: The use of experimental animal and human models to study the pathogenesis of chancroid was the subject of a recent review in this journal¹. Since the review was written, there have been several publications reporting new data from human experimental infections with *Haemophilus ducreyi* and I would like to take this opportunity to update the readership with some of this new information.

In their original description of experimental human infection, Spinola *et al.* inoculated the upper arm of 4 human volunteers with *H. ducreyi* using a Multi-Test Applicator (Lincoln Diagnostics, Decatur, Illinois, USA)². Volunteers were observed for a 3-day period before lesion biopsy and termination of the infection with oral ciprofloxacin. Experimental human infections are now allowed to proceed for up to 14 days or until volunteers develop a painful pustule or a pustule with an umbilicated centre that is likely to ulcerate. In practice, this means most volunteers are infected for 7-14 days and the model continues to be safe and well-tolerated by the subjects³.

Recent data obtained using the human model have demonstrated that the immune response to *H. ducreyi* infection resembles a delayed-type hypersensitivity reaction throughout the course of experimental infection⁴. Papules and pustules contained a predominant infiltrate of T cells (mainly CD4+) and macrophages with a few B cells similar to that seen in natural infection⁵. The experimentally-induced pustules were shown histologically to contain epidermal ulcerations in that the keratinocyte layer was destroyed and replaced by a polymorphonuclear cell infiltrate⁴. Although

infection in the human model is terminated before ulceration occurs, it is likely that pustule formation observed with the model represents the early phase of the ulcerative stage of *H. ducreyi* infection. The humoral response to natural chancroid infection, as measured by adsorption enzyme immunoassay, occurs as the disease progresses into the ulcerative stage with the best results obtained with sera from patients who have had a genital ulcer in excess of 4 weeks⁶. This is in keeping with the lack of a humoral immune response observed in volunteers infected experimentally in Spinola's model which is terminated before clinically detectable ulceration occurs².

Animal models of diseases caused strictly by human pathogens are inherently imperfect models for the study of pathogenesis and often require inoculation with extremely high colony-forming units (CFUs) of the pathogen concerned. This is certainly the case with *H. ducreyi* as inocula of 10⁴ CFU or greater are necessary to reliably produce lesions in the temperature-dependent rabbit model and inocula of 10⁷ CFU or greater were used to produce lesions in the male macaque experimental model¹. The pig model uses a similar applicator to that used in the human model for ear inoculation and the estimated delivered dose (EDD) of *H. ducreyi* is probably in the order of 10⁴ CFU¹. In contrast, an EDD of approximately 30 CFU has been reported to cause a papule formation rate of 95% and a pustule formation rate of 69% in Spinola's experimental human challenge model³. This estimate of the infectious dose of *H. ducreyi* is consistent with the probability of transmitting chancroid from an infected person to an uninfected sexual partner⁷. Accordingly, Spinola's human volunteers are currently inoculated at 2 sites with 30-60 CFU *H. ducreyi* for chemoprophylaxis or vaccine trials³. Isogenic *H. ducreyi* mutants for a number of potential virulence factors are also currently undergoing or awaiting assessment for decreased virulence in this model¹.

D A Lewis MRCP MSc
Wellcome Clinical Research Fellow,
Department of Genitourinary Medicine and
Communicable Disease, Imperial College School of
Medicine, St Mary's Campus, London W2 1NY, UK

References

- 1 Lewis DA. The use of experimental animal and human models in the study of chancroid pathogenesis. *Int J STD AIDS* 1999;10:71-9
- 2 Spinola SM, Wild LM, Apicella MA, Gaspari AA, Campagnari AA. Experimental human infection with *Haemophilus ducreyi*. *J Infect Dis* 1994;169:1146-50
- 3 Al-Tawfiq JA, Thornton AC, Katz BP, et al. Standardization of the experimental model of *Haemophilus ducreyi* infection in human subjects. *J Infect Dis* 1998;178:1684-7
- 4 Palmer KL, Schnizlein-Bick CT, Orazi A, et al. The immune response to *Haemophilus ducreyi* resembles a delayed-type hypersensitivity reaction throughout experimental infection of human subjects. *J Infect Dis* 1998;178:1688-97

Étude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomatis* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan.

H. Bankoïé (1), H. Faye-Ketté (1), G. Laruche (3), F. Dabis (4), C. Wellfens-Ekra (2) & M. Dosso (1)

(1) Laboratoire de bactériologie-virologie, Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(2) Service de gynécologie, CHU de Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(3) Programme national de lutte contre le sida, les MST et la tuberculose (PNLS/MST/TUB), Côte d'Ivoire.

(4) Université Bordeaux II, France.

Correspondance: Mme H. Faye-Ketté, 01 BP 1953 Abidjan 01, Côte-d'Ivoire. Tél. (225) 07 09 42 24. Fax: (225) 22 48 74 05. Email: fayeket@ci.refer.org

Manuscrit n° 2207. "Bactériologie". Reçu le 25 mai 2000. Accepté le 24 avril 2001.

Summary: Active *Chlamydia trachomatis* infection on symptomatic women in Abidjan using cell culture.

The object of our study has been to assess *Chlamydia trachomatis* prevalence among symptomatic women in Abidjan and to identify issues related to the use of cell culture methods in a tropical laboratory. 1522 women with vaginal discharge were enrolled in a cross sectional study. One endocervical swab was taken per woman and inoculated into cycloheximide treated Mac Coy cells. Elementary bodies were detected by direct fluorescent antibody (DFA).

The isolate rate of *Chlamydia trachomatis* by cell culture was estimated to 86%. The prevalence of chlamydial infection among symptomatic women was 10.8%. Culture was influenced by presence of blood or cervical mucus in the sample. 206 samples gave no results because of blood or cervical mucus. During this study repeated contaminations of cells with facultative bacteria were noted and disposing of a sufficient number of cells was not easy.

Résumé :

Chlamydia trachomatis a été recherchée par culture cellulaire dans les prélèvements endocervicaux de 1522 femmes ayant un écoulement vaginal incluses dans une étude transversale à Abidjan, afin de déterminer la prévalence de l'infection ainsi que les difficultés liées à l'utilisation d'une telle méthode dans un laboratoire en zone tropicale. Les prélèvements endocervicaux ont été inoculés sur des cellules Mac Coy traitées au cycloheximide. Les inclusions cytoplasmiques signant l'infection par *Chlamydia trachomatis* ont été révélées par immunofluorescence directe. Le taux de succès de la culture cellulaire dans cette étude était de 86,5 % (1316/1522). Ce taux était de 80 % lorsque les prélèvements étaient conformes et de 50,4 % lorsque ceux-ci étaient non conformes. La prévalence de l'infection chlamydienne, obtenue par cette méthode, était de 10,8 % (IC95: 9,3 -12,3). De nombreuses contaminations par les bactéries aéro-anaérobies facultatives ont été observées.

prevalence
Chlamydia trachomatis
cell culture
laboratory
Abidjan
Côte d'Ivoire
(Ivory Coast)
Sub-Saharan Africa

prévalence
Chlamydia trachomatis
culture cellulaire
laboratoire
Abidjan
Côte d'Ivoire
Afrique intertropicale

Introduction

Les maladies sexuellement transmissibles (MST) constituent, de par le monde, un problème majeur de santé publique. Nombre de ces MST sont provoquées par des agents capables d'engendrer au niveau des organes génitaux des lésions pouvant compromettre à jamais la fécondité. C'est le cas de *C. trachomatis*, dont l'infection, souvent discrète et sournoise chez la femme, évolue à bas bruit et peut conduire à la stérilité tubaire. De nombreux travaux (3, 5, 9, 10) révèlent que les infections dues à *C. trachomatis* occupent une place importante dans l'étiologie des MST. Parmi les différentes techniques de détection utilisées, la culture sur cellules permissives est la méthode de référence (1), car elle seule permet de diagnostiquer une chlamydie génitale évolutive. En Côte d'Ivoire, quelques études sur la prévalence de *C. trachomatis* dans les infections génitales ont été menées par

SANON et coll. en 1992 (12), par FAYE-KETTE et coll. en 1995 (6), puis en 1996 (5, 7). Toutes ces études ont montré un taux de prévalence élevé de *C. trachomatis* dans les infections génitales chez les femmes à Abidjan. Mais, ces travaux ont utilisé soit la détection des corps élémentaires par immunofluorescence directe (IFD), soit la recherche des anticorps anti-*C. trachomatis* par immunofluorescence indirecte (IFI). Aucune de ces méthodes ne permet d'affirmer avec certitude le caractère évolutif de l'infection due à *Chlamydia*. Il apparaissait alors opportun que ces études antérieures soient complétées par d'autres basées sur l'isolement de *C. trachomatis* par culture cellulaire.

Le présent travail se propose d'appliquer la technique de culture cellulaire au dépistage de l'infection par *C. trachomatis* chez des femmes consultant dans une clinique de gynécologie à Abidjan en vue d'identifier les difficultés liées à l'utilisation de cette technique dans un laboratoire de zone tropicale.

Matériel et méthodes

Patientes

Nous avons enrôlé dans une étude transversale 1 522 femmes consultant dans la clinique gynécologique du centre de santé de Yopougon (commune d'Abidjan) pour un écoulement génital, associé ou non à des douleurs pelviennes et à une dysurie. Les prélèvements endocervicaux ont été réalisés sous spéculum non lubrifié à l'aide d'un écouvillon abrasif de type "bactopick", après mouchage du col avec un tampon stérile. Les prélèvements ont été par la suite déchargés dans 2 ml de 2 sucrose-phosphate (2SP), enrichi en sérum de veau fœtal et rendu sélectif par l'adjonction de gentamicine et de fungizone, puis conservés à -70°C jusqu'à l'inoculation.

Détection de *C. trachomatis* par culture cellulaire

Les cellules MAC COY ont été entretenues et inoculées selon la technique classique de culture cellulaire. Le milieu de EAGLE utilisé à cette fin contenait 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les différentes incubations ont été réalisées à 37°C sous 6,5 % de CO_2 . Cette étape de l'étude a permis de disposer d'une quantité suffisante de cellules et d'en conserver dans du milieu de Eagle additionné de 10 % de diméthyl sulfoxyde. Le tapis cellulaire, destiné à l'inoculation des prélèvements a été obtenu dans des plaques de 24 puits après 24 heures d'incubation d'une suspension à 10^5 cellules/ml distribuée à raison de 1 ml par puits.

Avant inoculation des lignées cellulaires, l'aspect macroscopique des prélèvements a été noté. Selon que ceux-ci contenaient de la glaire ou du sang ou n'avaient aucune caractéristique particulière, ils ont été classés pour les premiers en prélèvements non conformes et pour les autres en prélèvements conformes pour la culture. Ensuite, un traitement visant à libérer les corps élémentaires des cellules génitales a été réalisé. Les prélèvements ainsi traités ont été utilisés pour inoculer les cellules MAC COY, à raison de 2 ml de suspension de produit biologique par puits.

Après inoculation, les plaques ont été centrifugées à 2 500 tours par minute pendant 1 heure à 37°C , puis maintenues en incubation pendant 2 heures sous 6,5 % de CO_2 . L'inoculum a été par la suite retiré et remplacé par du milieu de Eagle enrichi en vitamines, en acides aminés, en glucose et en cycloheximide.

Les inclusions cytoplasmiques signant l'infection par *C. trachomatis* ont été recherchées après 48 heures d'incubation par immunofluorescence directe, à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-*C. trachomatis*. Le nombre d'inclusions cytoplasmiques par lame a été noté.

Analyse statistique

Au plan statistique, les variables obtenues ont été comparées deux à deux à l'aide du test de χ^2 de MANTEL HAENSZEL avec correction de YATES.

Résultats

Selon l'aspect macroscopique, deux types de prélèvements ont été notifiés. Ce sont les prélèvements jugés conformes pour la culture cellulaire (prélèvements ayant un aspect macroscopique sans particularité) et les prélèvements non conformes (prélèvements contenant du sang et/ou de la glaire). Les prélèvements conformes représentaient 78,3 % (1 191/1 522) des cas et les prélèvements non conformes 21,7 % (331/1 522).

Tableau I.

Répartition des prélèvements selon leur conformité pour la culture cellulaire.
Distribution of tests according to conformity by cell culture.

	cultures (nb = 1 522)	
	interprétables nb = 1 316 (%)	ininterprétables nb = 206 (%)
prélèvements conformes (nb = 1 191)	1 149 (87,3)	42 (20,4)
prélèvements non conformes (nb = 331)	167 (12,7)	164 (79,6)
- avec du sang (nb = 294)	148	146
- avec de la glaire (nb = 37)	19	18

Parmi ceux-ci, 19,3 % (294/1 522) contenaient du sang et 2,4 % (37/1 522) de la glaire. Bien qu'ils fussent non conformes, ces prélèvements ont étéensemencés dans le but de déterminer l'influence du sang et de la glaire sur les cellules.

Après culture, 1 316 prélèvements ont pu être interprétés dont 87,3 % (1 149/1 316) de prélèvements conformes et 12,7 % (167/1 316) de prélèvements non conformes. Ceci situe le taux de succès de la culture cellulaire dans cette étude à 86,5 % (1 316/1 522). 206 prélèvements sur 1 522 (13,5 %) n'ont pu être interprétés, dont 42 prélèvements conformes soit 20,3 % (42/206) et 164 prélèvements non conformes, soit 79,6 % (164/206) (tableau I). Les prélèvements n'ont pu être interprétés, soit du fait de l'absence de tapis cellulaire, soit du fait de la non viabilité des cellules. Ainsi, les prélèvements conformes n'ont pu être interprétés dans 54,8 % par absence de tapis cellulaire et dans 45,2 % des cas par absence de cellules viables. La plupart des prélèvements non conformes, 67,1 % des cas, n'ont pu être interprétés à cause de la non viabilité des cellules.

Parmi les 1 316 prélèvements interprétés, 143 ont présenté des inclusions, ce qui situe la prévalence de l'infection par *C. trachomatis* à 10,8 % (IC_{95} : 9,3 - 12,3) et 1 173, soit 89,2 %, ont été négatifs. On notait une prévalence de l'infection chlamydienne de 10,9 % (126/1 149) lorsque les prélèvements étaient conformes, de 8,1 % (12/148) lorsque les prélèvements contenaient du sang et de 26,3 % (5/19) lorsque les prélèvements contenaient de la glaire (tableau II). Au plan statistique, il n'existait pas de différence entre le taux de positivité des prélèvements conformes et celui des prélèvements contenant du

Tableau II.

Répartition des prélèvements selon leur positivité à la culture.
Distribution of tests according to culture positivity.

	cultures interprétables (nb = 1 316)	
	positives nb = 143 (%)	négatives nb = 1 173 (%)
prélèvements conformes (nb = 1 149)	126 (88,1)	1 023 (87,3)
prélèvements non conformes (nb = 167)	17 (11,9)	150 (12,7)
- avec du sang (nb = 148)	12	136
- avec de la glaire (nb = 19)	5	14

sang ($p = 0,12$). Cependant la prévalence était significativement élevée lorsque le prélèvement contenait de la glaire.

Après 48 heures d'incubation, les petites inclusions cytoplasmiques étaient plus fréquemment rencontrées que les grosses et moyennes inclusions: 49,7 % contre 22,4 % et 27,9 %, respectivement. De plus, la plupart des prélèvements analysés étaient peu chargés en antigène de *Chlamydia*; ainsi 60 % des prélèvements analysés comportaient moins de 100 unités formant inclusion par millilitre (UFI/ml).

Discussion

Cette étude, dont l'objectif essentiel était de valider la technique d'isolement de *C. trachomatis* par culture

cellulaire dans un laboratoire de zone tropicale, n'a pas permis d'obtenir les performances de la culture cellulaire en terme de sensibilité et de spécificité, puisque cette méthode de détection a été utilisée seule. Cependant, la culture a été effectuée avec un taux de succès de 86,5 %, taux représentant l'ensemble des cultures qui ont pu être interprétées. Ce taux observé est supérieur à celui indiqué par RIDGWAY et coll. (11) qui ont obtenu entre 75 % et 80 %, en 1990, en Angleterre, et à ceux de Van DYCK et coll. (14) qui étaient de 62 % chez les prostituées et de 76 % chez les femmes enceintes au Sénégal, en 1992.

Dans cette étude, seul un prélèvement endocervical a été analysé. BARNES et coll. (2), en 1990 aux États-Unis, ont montré que la sensibilité de la culture est améliorée de 70 à 80 % lorsque plusieurs prélèvements endocervicaux par patiente sont utilisés. Certains prélèvements n'ont pu être interprétés, soit par absence de cellules viables, soit par absence de tapis cellulaire. La plupart des prélèvements pour lesquels cette situation a été observée contenaient du sang. Ce résultat démontre le caractère cytotoxique et peut-être cytolytique du sang sur les cellules MAC COY. Toutefois, un phénomène analogue a été observé avec quelques prélèvements qualifiés d'adaptés à la culture cellulaire. Cela pourrait s'expliquer, comme l'a proposé DAVID (4) en 1990, par la présence dans ces prélèvements de sécrétions vaginales contenant une forte concentration de bactéries dont les produits du métabolisme sont toxiques pour les lignées cellulaires. Enfin, des facteurs non déterminés peuvent aussi avoir été à l'origine de la mort des cellules MAC COY. L'absence de tapis cellulaire peut être la conséquence d'un décollement du tapis cellulaire au cours des étapes de lavages et de coloration. Ce phénomène est bien connu lorsque l'immunofluorescence directe est utilisée (13).

Dans cette étude réalisée chez des femmes symptomatiques, la prévalence de 10,8 % est inférieure à celle de 13,7 % obtenue par SANON et coll. (12) dans une étude effectuée en 1992, à Abidjan, dans une population identique. Au Sénégal, une étude menée par VAN DYCK et coll. (14), en 1992, chez des femmes enceintes et des prostituées, et utilisant la culture cellulaire, a montré respectivement des prévalences de 14,6 % et de 14,3 %. De même, en 1989, BARNES et coll. (2) ont estimé par la même technique dans une population féminine à risque aux États-Unis, cette prévalence à 24,6 %.

L'importance de l'infection chlamydienne a déjà été montrée à Abidjan. En effet, une enquête sérologique, réalisée en 1996 à Abidjan (5) dans cette même population, a montré que 70 % des femmes analysées avaient des anticorps anti *Chlamydia* à un titre supérieur ou égal à 64. Une prévalence relativement élevée de l'ordre de 30 % a été également retrouvée chez des femmes ayant une cervicite (7). Les différences observées entre ces taux et celui de cette étude sont probablement liées aux méthodes utilisées. En effet, SANON et coll. ont utilisé l'immunofluorescence directe comme méthode de détection, alors que cette étude a utilisé la culture cellulaire qui, bien que lourde et chère, demeure la méthode de référence avant le développement des techniques de biologie moléculaire qui tendent à la remplacer à l'heure actuelle.

La plupart des prélèvements analysés ont montré de petites et moyennes inclusions. Ce résultat pourrait être lié, soit à la durée de conservation des prélèvements à -70 °C, soit à la durée d'incubation des cellules après leur inoculation, soit au fait que seul un passage a été effectué par prélèvement. En ce qui concerne la conservation prolongée des prélèvements à -70 °C, son influence sur la culture cellulaire est bien connue.

En effet, des auteurs comme MAHONY et coll. (8) ont décrit le rôle du délai de conservation sur la viabilité des *Chlamydia*. Dans cette étude, pour des raisons d'ordre technique, les prélèvements ont été ensemencés pour la plupart après douze mois de conservation à -70 °C. Ce délai de conservation pourrait expliquer la taille des inclusions observées. Quant à la durée d'incubation des cellules après inoculation, celle-ci était de 48 heures. La durée classique du cycle de multiplication de *C. trachomatis* étant de 48 à 72 heures, certaines souches de notre série qui étaient de croissance lente n'ont pu atteindre leur maturité. Un prolongement de l'incubation aurait permis une meilleure expression des souches car, comme le souligne BARNES (1), la probabilité d'obtenir de grosses inclusions au premier passage est moins élevée que lors des autres passages, d'où la nécessité d'effectuer plusieurs passages. Ces trois alternatives peuvent être envisagées.

Au cours de cette étude, les difficultés rencontrées ont essentiellement concerné l'entretien des cellules. En effet, au cours de leur entretien, les cellules, bien que viables, ont perdu leur pouvoir d'adhérence. Ceci était la conséquence d'une altération du milieu d'entretien des cellules par appauvrissement en facteurs de croissance, ainsi que d'une rupture de la chaîne de froid. Dans le premier cas, l'enrichissement du milieu en sérum de veau fœtal à une concentration de 10 % a permis aux cellules de recouvrer leur pouvoir d'adhérence. Dans le deuxième cas, un nouvel approvisionnement en cellules MAC COY a été nécessaire. Pendant une période de deux mois, les cellules ont été contaminées par une souche de *Staphylococcus aureus* méticillino-résistante et résistante aux aminoglycosides. Cette souche, probablement d'origine nosocomiale, a pu contaminer les cellules par l'intermédiaire de la verrerie utilisée. En effet, cette verrerie était recyclée et conditionnée au même endroit que la verrerie utilisée pour réaliser le diagnostic des infections hospitalières. Une contamination du matériel de culture cellulaire a pu survenir à ce moment-là. La contamination a été enrayerée par l'adjonction de vancomycine au milieu de culture cellulaire et par la récupération séparée de la verrerie utilisée. L'approvisionnement en lignées cellulaires n'a pas été aisé. La plupart du temps, plusieurs envois ont été nécessaires, les cellules étant souvent affectées par les conditions défectueuses de conservation au cours du transport.

Conclusion

Au terme de cette étude, le taux de succès de la culture cellulaire était de 86,5 % ; la prévalence de la chlamydie génitale active dans la population féminine à Abidjan a été estimée à 10,8 %. Les problèmes identifiés ici sont connus des laboratoires de culture cellulaire. Ce sont la contamination et la perte de pouvoir d'adhérence des cellules. Par ailleurs, l'approvisionnement en lignées cellulaires a constitué un problème spécifique à notre étude. Malgré les difficultés sus-citées, l'isolement de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire est possible dans un laboratoire de zone tropicale, en attendant l'utilisation des techniques d'amplification génique qui sont beaucoup plus sensibles.

Remerciements

Les fonds ayant servi à cette étude nous ont été fournis par l'ANRS (Projet Dyser-CI). Nos sincères remerciements vont au Professeur SALAMON (Université Bordeaux II) et au Professeur ORFILA (CHU Nord Amiens).

Références bibliographiques

1. BARNES RC - Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev*, 1989, **2**, 119-136.
2. BARNES RC, KATZ BP, ROLFS RT, BATTEIGER B, CAINE V & JONES RB - Quantitative culture of endocervical *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**, 774-780.
3. BEZIAN MC, PELLETIER JR, LABROUSSE P, DIALLO B & BEZIAN JH - Enquête séro-épidémiologique sur les MST à *Chlamydia trachomatis* à Casablanca (Maroc). *Bull Soc Pathol Exot*, 1992, **85**, 125-129.
4. DAVID HM - *Chlamydia* infections/ Sexually Transmitted Diseases. *Medical clinics of North America*, 1990, **74**, 1367-1387.
5. FAYE-KETTE H, N'DOBO P, DOSSO M & WELFFENS-EKRA C - Prévalence des anticorps anti-*Chlamydia trachomatis* chez des femmes infertiles au CHU de Yopougon (Abidjan) : étude préliminaire. Communication orale, 1er congrès scientifique Société africaine de microbiologie, février 1996, Bamako.
6. FAYE-KETTE H, SYLLA-KOKO FD, N'DOUBA-KACOU A, BOUZID S, ANOMA C et al. - Prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis* dans les urétrites chez l'homme à Abidjan. Poster, 8ème Conférence internationale SIDA et MST en Afrique, décembre 1993, Marrakech.
7. FAYE-KETTE H, YEBARTH S, DOSSO M & WELFFENS-EKRA C - Prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis* dans les cervicites à Abidjan : étude préliminaire. Communication orale, 1er congrès Société africaine de microbiologie, février 1996, Bamako.
8. MAHONY JB & CHERNESKY MA - Effect of swab and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1985, **22**, 865-867
9. ORFILA J - Diagnostic d'une infection à *Chlamydia*. *LABORAMA*, 1991, **32**, 12-17.
10. PERRIN R, MASSOUGBODJI A, OFFRIN G, DE SOUZA J, ANAGOU S et al. - Infections génitales basses à *Chlamydia trachomatis* chez la femme à Cotonou. *Pub Méd Afr*, 1992, **121**, 19-20.
11. RIDGWAY GL & TAYLOR-ROBINSON D - Current problems in Microbiology: *Chlamydia* infections: which laboratory test? *J Clin Pathol*, 1991, **44**, 1-5.
12. SANON S, GERSHY-DAMET GM, M'BOUP S, KOFFI K, SORO BN et al. - Prévalence de *Chlamydia trachomatis* dans des prélèvements génitaux à Abidjan. *Bull Soc Pathol Exot*, 1992, **85**, 209-211
13. TAYLOR-ROBINSON - The value of the non-culture techniques for detection of *Chlamydia trachomatis* infections: making the best of a bad job. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992, **11**, 499-503.
14. VAN DYCK E, SAMB N, DIENG SARR A, VAN DE VELDEN L, MORAN J et al. - Accuracy of two enzyme immuno assays and cell culture in the detection of *Chlamydia trachomatis* in low and high risk populations in Sénégal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992, **11**, 527-534.

EVALUATION DU PREMIER JET D'URINES DANS LE DIAGNOSTIC DE
L'INFECTION A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* CHEZ DES PATIENTS
SYMPTOMATIQUES A ABIDJAN

H.Faye-Kette, Y. Allangba, H. Bankolé, A. Kouassi-M'Bengue, S. Bouzid et M. Dosso

Unité des Infections sexuellement transmissibles, Institut Pasteur, Abidjan, Côte-d'Ivoire

Correspondance : Mme H. Faye-Ketté

01 BP 1953 Abidjan 01

Tel (225) 07 09 42 24

Fax (225) 22 48 74 05

E-Mail : fayeket@yahoo.fr

RESUME :

En vue de déterminer la place des échantillons de premier jet d'urines dans le diagnostic de la chlamydie génitale, la détection de *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de premier jet d'urines a été comparée à la détection de cette bactérie dans les sécrétions génitales (urètre, endocol). Dans les deux cas l'immunofluorescence directe a été utilisée comme méthode de détection. Les prévalences de *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de premier jet d'urines et dans les échantillons de sécrétions génitales étaient respectivement de 20 % et de 26.3 % chez la femme, de 20.5 % dans les deux cas chez les hommes. La sensibilité et la spécificité de la détection de *Chlamydia trachomatis* dans les échantillons de premier jet d'urines par rapport aux échantillons de sécrétions génitales étaient de 100 % et 100 % chez l'homme et de 100 % et 94.7 % chez la femme. De plus, les échantillons de premier jet d'urines se sont montrés plus riches en corps élémentaires (> 10 corps élémentaires/ champ) que les échantillons de sécrétions génitales (43.7 % vs 38 % chez l'homme et 28.6 % vs 20 % chez la femme. Les échantillons de premier jet d'urines représentent une bonne alternative dans la détection de *C. trachomatis* comparés aux échantillons de sécrétions génitales, notamment chez l'homme lorsque l'écoulement génital est peu abondant ou absent. De plus, la fréquence des échantillons pauci-bacillaires exige l'utilisation de technique plus sensibles.

Mots – clé : *Chlamydia trachomatis* – Evaluation premier jet d'urines – infections génitales

TITTLE : EVALUATION OF FIRST-VOID-URINE FOR THE DIAGNOSIS OF GENITAL *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* INFECTIONS ON SYMPTOMATIC PATIENTS

Background : Treating and or screening for sexually transmitted infections in a greater proportion of sexually active patients has become a large and widely used strategies to prevent HIV transmission in subsaharian african countries. The propose of this study was to evaluate detection of *Chlamydia trachomatis* genital infection on first void urine (FVU) compare to detection on genital secretions on men and women with few symptoms..

Study design : seventy eight men and thirty eight women were included. On each patient one urethral or endocervical swab and one first void urine were collected in non random order. DFA test was performed on ali the specimens and the number of elementary (EB) was noted to assess the organism load.

Results : The overall *Chlamydia trachomatis* prevalence was respectively on FVU and genital specimens 20.5 % and 20.5 % on men and 20 % 26.3 % on women. Compare to genital specimens detection of *C. trachomatis* in FVU had a sensitivity and a specificity of 100 % on men and 100 % sensitivity and 94,7 % specificity on women. Proportion of men and women with low organisms load <10 EB by DFA was high on women 80 % on genital specimens and 71.4 % on FVU and for the men 62.5% on genital specimens and 56.3 % on FVU.

Conclusion : The finding suggest that FVU is a simple and non invasive specimen for detection of *C. trachomatis* infection on patients with few symptoms. The small number of EB on the different specimens performed allow us to advocate for the use of tests which can detect low numbers of the organisms both in urine and genital secretions.

Key-words : *Chlamydia trachomatis* genital infection – Evaluation of first void urine

INTRODUCTION

Les Maladies Sexuellement Transmissibles (MST) constituent de par le monde un véritable problème de santé publique. Au nombre des agents pathogènes responsables de ces pathologies, *Chlamydia trachomatis* occupe une place importante. En effet, 10 à 20% de la population mondiale est infectée par cette bactérie. Aux Etats Unis, ce sont 10 millions de personnes par an dont 20% d'adolescents qui sont concernés [7, 8, 15]. En France, *C. trachomatis* est responsable de 50 à 80% des infections génitales hautes [1, 9]. En Afrique noire francophone et au Maghreb, il a été rapporté que le syndrome inflammatoire pelvien, tableau clinique fréquent des chlamydioses génitales dans les pays africains, était à l'origine de 25 à 50% des hospitalisations en gynécologie [12]. En Côte d'Ivoire, des études menées par SANON et coll. En 1992 [18], MENSAH-ADO et coll. [16], BANKOLE en 2001 [3], ont montré une prévalence élevée de *C. trachomatis* dans les infections génitales à Abidjan.

Plusieurs techniques permettent de poser le diagnostic biologique des infections génitales à *C. trachomatis*. Au nombre de ces techniques, l'immunofluorescence directe est de pratique courante [5,22,23,24]. Mais, comme les autres techniques de diagnostic des infections génitales à *C. trachomatis*, l'immunofluorescence directe reste tributaire de la qualité des échantillons biologiques. Ainsi, l'échantillon de sécrétions génitales riche en cellules, constitue l'échantillon de référence. Cependant cet échantillon se révèle souvent invasif et traumatisant pour le patient [6]. D'où la nécessité d'évaluer d'autre type d'échantillon biologique moins douloureux et n'affectant pas la qualité du résultat. Certains auteurs ont utilisé à cet effet, une nouvelle approche consistant à rechercher la bactérie dans les échantillons de premier jet d'urines avec beaucoup de succès [6,7,8,10 ,14,15,19,23] Notre laboratoire est en situation de référence et reçoit de ce fait des patients ayant peu ou pas d'écoulement génital car souvent référés après un échec thérapeutique constaté après un

traitement institué sur l'approche syndromique. De ce fait la technique de prélèvement urétral utilisée est le plus souvent un grattage urétral notamment chez l'homme et il n'est pas rare de constater quelque saignement au cours du prélèvement toute chose qui non seulement est douloureuse pour le patient mais qui gêne également la recherche de *C. trachomatis*.

Le présent travail se propose donc d'évaluer la détection de *C. trachomatis* à partir d'un échantillon biologique non invasif, les échantillons de premier jet d'urines et de comparer les résultats obtenus à ceux donnés par la technique de prélèvement de référence qui est le recueil des sécrétions génitales en utilisant comme test de diagnostic l'immunofluorescence directe.

MATERIEL ET METHODES

Patients : 73 hommes et 38 femmes âgés de plus de 15 ans et consultant pour un écoulement génital, une dysurie ou des douleurs urétrales ont été enrôlés dans une étude transversale. Les prélèvements d'échantillons suivants ont été réalisés : chez l'homme un échantillon de sécrétions urétrales et un échantillon de premier jet d'urines et chez la femme un échantillon de sécrétions endocervicales ainsi échantillon de premier jet d'urines. L'ordre des prélèvements n'a pas été randomisé. Le prélèvement des échantillons de sécrétions génitales a toujours précédé le prélèvement des échantillons de premier jet d'urines.

Microbiologie : Chez l'homme le prélèvement de deux échantillons de sécrétions urétrales a été réalisé. L'un a été déchargé sur un milieu de Thayer et Martin pour l'isolement de *N. gonorrhoeae* et l'autre a servi à confectionner un frottis pour la recherche de *C. trachomatis*. Chez la femme un frottis du cul de sac postérieur a été réalisé puis coloré au Gram dans le but de mettre en évidence une infection vaginale, (vaginite, vaginose) puis un prélèvement d'échantillon de sécrétions endocervicale a été effectué en vue de rechercher *N. gonorrhoeae* et de *C. trachomatis*. Après le prélèvement des échantillons de sécrétions génitales, 10 ml

d'urines du premier jet ont été recueillis aussi bien chez l'homme que chez la femme. Les urines ont été centrifugées à 2000 tours/mn pendant 10 mn et Le culot a servi à confectionner le frottis pour l'immunofluorescence directe. *C. trachomatis* a été recherché à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* fixé à la fluorescéine (Pathfinder Chlamydia, KALLESTAD DIAGNOSTIC).

Analyse statistiques : Au plan statistique, les variables obtenues ont été comparées deux à deux à l'aide du test de khi carré de MANTEL HAENSZEL avec correction de YATES

RESULTATS

C. trachomatis a été détecté dans les échantillons de sécrétions génitales et dans les échantillons de premier jet d'urines de 16 patients de sexe masculin sur les 78 testés soit une prévalence de 20.5 %. Chez les femmes *C. trachomatis* a été retrouvé 10 fois dans les échantillons de sécrétions d'endocol soit une prévalence de 26.3 % et 8 fois au niveau des échantillons de premier jet d'urines soit une prévalence de 20 %. La sensibilité et la spécificité de la détection de *C. trachomatis* par immunofluorescence dans les échantillons de premier jet d'urines comparées aux échantillons de sécrétions génitales étaient respectivement de 100 % et 100 % chez l'homme et de 80 % et de 94.7 % chez la femme (Tableau I). Les valeurs prédictives positives étaient de 100 % chez l'homme et la femme tandis les valeurs prédictives positives étaient de 100 % chez l'homme et la femme tandis les valeurs prédictives négatives étaient de 100 % et de 90.3 % chez l'homme et la femme.

Le nombre moyen de corps élémentaires observés par champ microscopique a été notifié aussi bien dans les sécrétions génitales que dans les urines du premier jet. Chez l'homme 14 fois le nombre de corps élémentaires observés dans les échantillons de premier jet d'urines était supérieur à celui observé dans les échantillons de sécrétions génitales. Ce qui n'était pas le cas chez les femmes où l'on ne notait pas de différence entre les deux types d'échantillons. Le

nombre de corps élémentaires mise en évidence a été utilisé pour classifier les échantillons afin de juger de leur richesse en antigène de *C. trachomatis*. Deux groupes d'échantillons ont été constitués par rapport à cette classification. Ceux qui contenaient moins de 10 corps élémentaires/champ et ceux qui en contenaient plus de 10. Ainsi chez l'homme, 62,5 % des échantillons de sécrétions génitales et 56,3 % des échantillons de premier jet d'urines contenaient moins de 10 corps élémentaires/champ. Concernant le groupe des échantillons ayant plus de 10 corps élémentaires/champ, les échantillons de premier jet d'urines semblaient plus chargés en bactéries que les échantillons de sécrétions génitales cependant les différences observées n'étaient pas statistiquement significative (43,7 % et 37,5 %, $p = 0,39$).

Chez la femme, 80 % des échantillons de sécrétions génitales et 71,4 % des échantillons de premier jet d'urines contenaient moins de 10 corps élémentaires. Ici également la différence observée entre les deux types d'échantillons n'étaient pas statistiquement significative lorsque le nombre de corps élémentaires étaient supérieur à 10 par champ microscopique ($p = 0,13$) (Tableau II).

Enfin 70 % des femmes chez lesquelles *C. trachomatis* a été mis en évidence présentaient un écoulement génital sans modifications morphologiques en faveur d'une exocervicite. L'analyse des infections vaginales dans la population étudiée a montré que 42,1 % (16/38) avaient une vaginite à *Candida albicans*, 26,3 % (10/38) une vaginose bactérienne et 5,3 % (2/38) une vaginite à *Trichomonas vaginalis*. Dans 5 cas, l'infection à *C. trachomatis* était associée soit à *C. albicans* soit à une vaginose bactérienne.

DISCUSSION

Les échantillons de premier jet d'urines ont été comparés aux échantillons de sécrétions génitales pour la détection de *C. trachomatis* chez des patients symptomatiques utilisant l'immunofluorescence comme technique de détection. Concernant la technique de détection

utilisée, celle-ci permet de mettre en évidence les corps élémentaires extracellulaires à l'aide d'anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux utilisés sont dirigés soit contre la protéine majeure de la membrane externe, antigène de type (Mycrotak de SYVA (USA), Pathfinder de KALLESTAD (USA), Monofluor (USA), soit contre le lipopolysaccharide de paroi, qui est un antigène de germe (Imagen (USA)), soit contre les deux antigènes à la fois (Clonatec, France). La majorité de ces tests d'Immunofluorescence directe présente une bonne sensibilité comparée aux autres méthodes de détection de *C. trachomatis* à savoir la recherche des inclusions cytoplasmiques sur frottis colorés au Giemsa ou les réactions immuno-enzymatiques type ELISA. Une étude comparative de la sensibilité de 29 trousse de détection des infections à *C. trachomatis*, récemment réalisée par BIANCHI [5] dans le cadre d'une réévaluation pour l'Agence du médicament en France, a permis de montrer que les trousse de Biologie moléculaire présente une excellente sensibilité et tendent actuellement à disputer à la culture sa place de technique de référence. Cependant, la plupart des trousse d'Immunofluorescence directe testés dans cette étude ont une bonne sensibilité et détectent la présence de moins de 10 corps élémentaires, constat rapporté également par THOMAS et coll.[23]. Cette technique mérite alors d'être privilégiée par rapport aux techniques ELISA. En effet toujours selon BIANCHI [5] les tests immuno-enzymatiques manquent dans l'ensemble de sensibilité et ne deviennent positifs que lorsque l'échantillon contient plus de 50 corps élémentaires.

L'immunofluorescence demeure donc une bonne alternative dans le diagnostic des infections génitales à *C. trachomatis* lorsque la culture ou les méthodes de biologie moléculaire ne sont pas disponibles. En effet Les techniques de biologie moléculaire en particulier les techniques d'amplification génique, présentent la meilleure sensibilité et permettent de détecter moins de 1 corps élémentaire dans les sécrétions génitales et tendent de ce fait à devenir le « standard d'or ». La culture cellulaire est la méthode de référence car elle permet de mettre en évidence

la bactérie vivante. Mais, elle est lourde et sa sensibilité est de 70 à 80 %. Celle-ci est améliorée lorsque plusieurs passages sont effectués. Tous ces procédés diagnostiques nécessitent des échantillons biologiques de bonne qualité. Les échantillons de sécrétions génitales riches en cellules épithéliales se prêtent à toutes ces méthodes. Cependant, ces échantillons sont invasifs. Une alternative pour le diagnostic des infections à *C. trachomatis*, est la détection de la bactérie au niveau des échantillons de premier jet d'urines. En effet, l'échantillon de premier jet d'urines est considéré comme un échantillon non invasif qui semble donner des résultats superposables à ceux des échantillons de sécrétions génitales [6,7,8,10,14,15,19,20].

La détection de l'antigène *Chlamydia* par immunofluorescence directe pratiquée sur les échantillons de premier jet d'urines dans cette étude au cours de laquelle un test basé sur un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine majeure de la membrane externe a été utilisée, a montré chez l'homme une bonne sensibilité comparée aux échantillons de sécrétions urétrales. Chez la femme, la sensibilité était moins bonne. Les performances obtenues corroborent celles de TAYLOR-ROBINSON [21] qui a montré que les résultats observés dans les échantillons de premier jet d'urines sont superposables à ceux obtenus dans les échantillons de sécrétions urétrales chez les hommes quelle que soit la méthode utilisée à savoir l'immunofluorescence directe, les techniques ELISA ou les techniques de Biologie moléculaire. Chez l'homme, les résultats des échantillons de premier jet d'urines suffisent donc pour poser le diagnostic de l'infection génitale à *C. trachomatis*. Par contre chez la femme, les résultats des échantillons de premier jet d'urines sont moins bons et nécessitent l'utilisation de méthodes plus sensibles telle que la culture cellulaire ou la biologie moléculaire. Chez celles-ci, la recherche des corps élémentaires dans les échantillons de premiers jets d'urines doit toujours être complétée par une recherche au niveau de l'endocol.

Les prévalences de *C. trachomatis* obtenues dans cette étude sont estimées à 22% chez les hommes et à 26% chez les femmes. Cette prévalence de *C. trachomatis* chez les hommes, est inférieure à celle de 28.4% observée par SANON et coll. [18] qui ont travaillé sur des populations similaires. La prévalence de 26 % chez les femmes est élevée par rapport à celle de 13.7% indiquée par SANON et coll. [18] en 1992, à celle de 10.8 % obtenu par BANKOLE [3] en 2001. La différence observée pourrait s'expliquer d'une part par les méthodes utilisées, le dernier auteur ayant réalisé l'isolement de la bactérie par culture cellulaire sur cellules Mac Coy, et d'autre part par la différence entre les populations étudiées. En effet BANKOLE et coll. [3] ont travaillé sur des femmes asymptomatiques alors que cette étude a ciblé essentiellement les femmes symptomatiques.

Le nombre de corps élémentaires observés dans cette étude dans les deux types de prélèvement est généralement compris entre 5 et 10 aussi bien chez les hommes que chez les femmes, montrant ainsi la faible charge des échantillons en corps élémentaires. Cette situation pourrait être liée à certains facteurs pouvant influencer la quantité d'antigène ou de corps élémentaires dans les échantillons. Ces facteurs sont connus et décrits. Il s'agit de la qualité de des échantillons, du transport et du stockage des échantillons puis de la sensibilité de la technique utilisée et même du traitement antibiotique préalablement reçu par le patient. En aucun cas n'intervient le caractère symptomatique ou asymptomatique de l'infection [23]. L'absence de cervicite chez 70 % des femmes ayant une infection à *C. trachomatis* confirme le caractère pauci-symptomatique de cette infection. Enfin, l'absence d'écoulement génital chez plus de 80% des hommes ayant une infection à *C. trachomatis* corrobore le caractère subaiguë de l'urétrite à *C. trachomatis*.

CONCLUSION

Les échantillons de premier jet d'urine représentent une bonne alternative dans la détection de *C. trachomatis* par rapport aux échantillons de sécrétions génitales, notamment chez l'homme lorsque aucun écoulement génital n'est observé. La fréquence des échantillons pauci-bacillaires exige l'utilisation de techniques plus sensibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ARCHAMBAUD M., CHAMBANNON G. – Diagnostic au laboratoire de pratique courante des infections uro-génitales à *C. trachomatis*. *Feuille de Biologie*, 1985, 26, 147 : 41-45.
2. ARDOIN P., PRADIER T. – Diagnostic des chlamydie sur 100 cas d'isolement. *Med Mal Infect*, 1992 ; 12 ; 6 : 367-369
3. BANKOLE H., FAYE-KETTE H., LARUCHE G., DABIS F., M. DOSSO, WELFENS-EKRA – Etude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomatis* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan. *Bull Soc Path Exot*, 2001; 94 ; 3 : 235-238
4. BARNES R. C. - Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev*, 1989 ; 2 : 119-136
5. BIANCI A. – Etude comparative de 29 trousse de diagnostic direct des infections à *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'Agence du médicament. *Rev Française des Laboratoires*, 1998, 306
6. CAUL EO PAUL ID MILNE JD- Non invasive sampling methods for detecting *Chlamydia trachomatis*. *Lancet* 1988 ; ii : 1246-1247

7. CHERNESKY M- Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens in urines as alternative to swabs and culture. *J Infec Dis*, 1990 ; **160** : 124-126
8. CHERNESKY MA, JANG D, LEE H – Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in men and women by testing first void urine by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1994 ; **32** : 2682-28685
9. DUTHIL B, BEBEAR C - Diagnostic bactériologique de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire. *Feuille de Biologie*, 1987 ; **28** ; 155 : 13-17
10. EHRET J M, LESZCZYNSKI J C, DOUGLAS J M, CHERNESKY M, MONCADA J SCHACHTER J- Evaluation of Chlamydiazym Immunoassay for detection of *Chlamydia trachomatis* in urines specimens from men. *J Clin Microbiol*, 1993 ; **31** ; 10 : 2702-2705.
11. JANIER M, LASSAU F, SCIEUX C, GRILLOT P, BIANCHI A, ABDENNADER S, PEROL Y, MOREL P – Fréquence d'isolement dans l'urètre d'homme avec ou sans écoulement urétral. *Rev Dermatol MST*, 1991 ; **3** ; 2 : 283-288
12. LE FAOU A, BEBEAR C, RIOU J- Diagnostic bactériologique des infections génitales. *Bull Soc Française Microbiol*, 1993 ; **8** ; 4 : 269-270
13. HAY PE, THOMAS BJ, HORNER PJ, MACLEOD E, RENTON AM, TAYLOR ROBINSON D – *Chlamydia trachomatis* in women: the more you look, the more you find. *Genitourin Med* 1994 ; **7** : 97-100
14. LAUDERDALE T, LANDERS L, THONEYCROFT I CHAPIN K – Comparison of the PACE 2 assay, Two amplification assay and Clearview EIA for detection of *Chlamydia trachomatis* in female endocervical and urines specimens *J Clin Microbiol*, 1999 ; **37** ; 7 : 2223-2229
15. MAHONY JB, LUINSTRA KE, SELLORS JW, JANG D, CHERNESKY MA- Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-

- void-urine from asymptomatic and symptomatic men. *J Clin Microbiol*, 1992 ; **30** ; 9 : 2241-2245
16. MENSAH-ADO I, FAYE-KETTE H, BOUZID S, DOSSO M, EHOUMAN A – Place de l'infection à *Chlamydia trachomatis* dans les oligoasthénospermies à Abidjan. *Med Afr Noire*, 1995 ; **42** ; 3 : 125-128.
 17. ORFILA J – Diagnostic d'une infection à *Chlamydia*. *Laborama*, 1991 ; **32** : 12-17.
 18. SANON S, GERSHY-DAMET G M, M'BOUP S, KOFFI K, SORO B, LECORRE M, FAYE H, DOSSO M – Prévalence dans les prélèvements génitaux à Abidjan. *Bull Soc Path Exot*, 1985 ; **85** : 209-211.
 19. SELLORS J – Rapid on site diagnostic of chlamydial urethritis in men by detection of antigens in urethral swabs and urine. *J clin Microbiol*, 1991 ; **29** : 407-409
 20. SCIEUX C – Urétrites masculines à *Chlamydia trachomatis*, critiques des examens biologiques. *Rev Eur Dermatol MST* , 1991 ; **3** ; 6 : 279-282.
 21. TAYLOR-ROBINSON D – Tests of infection with *Chlamydia trachomatis*. *Int J STD AIDS*, 1996 ; **7** : 19-26.
 22. TAYLOR-ROBINSON D, RENTON A – Diagnostic tests that are worthwhile for patients with sexually transmitted bacteria infections in industrialized countries. *Int J STD AIDS*, 1999 ; **10** : 1-4.
 23. THOMAS B J, PIERPOINT T, TAYLOR-ROBINSON, RENTON A – Quantification of *Chlamydia trachomatis* in cervical and urine specimen from women attending a genitourinary medicine clinic : implication for screening strategies. *Int J STD AIDS*, 1999 ; **9** : 448-451.
 24. THOMAS BJ, MACLEOD E, TAYLOR- ROBINSON D – Evaluation of sensitivity of 10 diagnosis assays for *Chlamydia trachomatis* by use of simple laboratory procedure. *J Clin Pathol*, 19993 ; **46** : 912-914

Tableau I : Prévalence de *C. trachomatis* dans les types de prélèvements

		Présence de <i>C. trachomatis</i>	
		Sécrétions génitales n = 26	Premier jet d'urines n = 23
Hommes	n = 78	16 (20,5%)	16 (20,5 %)
Femmes	n = 38	10 (26,3 %)	7 (18,4 %)

Tableau II : Nombre de corps élémentaires (CE) de *C. trachomatis* notés dans les prélèvements positifs

		Présence de <i>C. trachomatis</i>	
		Sécrétions génitales	Premier jet d'urines
Hommes n= 16			
	<10 CE	10 (62,5 %)	9 (56,3 %)
	>10 CE	6 (37,5 %)	7 (43,7 %)
Femmes n= 10			
	<10 CE	8 (80 %)	5 (71,4 %)
	>10 CE	2 (20 %)	2 (28,6 %)

Détection des immunoglobulines A endocervicales anti-*Chlamydia trachomatis* chez les femmes présentant des leucorrhées à Abidjan – Côte d’Ivoire

BANKOLE. H. S. ; FAYE-KETTE H ; WASSOUMBOU S. ; KACOU-N’DOUBA A. ; KOUASSI-M’BENGUE A. ; BOUZID S. A.; DOSSO M.

Unité des Agents des Infections Sexuellement Transmissibles, Institut Pasteur de Côte d’Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01.

Correspondance :

Mme FAYE-KETTE Hortense

01 BP 1953 Abidjan 01

Tél : (225) 07-094-224

Fax : (225) 22-487-405

E-mail : fayeket@yahoo.fr

Abidjan / Côte d’Ivoire

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer le diagnostic biologique de la chlamydie génitale, par la mise en évidence des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans les sécrétions génitales des femmes à Abidjan.

Les prélèvements endocervicaux ont été réalisés dans du tampon phosphate salin (PBS) à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, chez 100 femmes en âge d'activité sexuelle et ayant un écoulement vaginal. Après centrifugation des prélèvements, les immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* ont été recherchées sur les surnageants à l'aide de lames infectées par *Chlamydia trachomatis*. Les particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* ont été recherchées sur tous les culots par immunofluorescence directe.

Utilisant l'immunofluorescence directe comme référence, les performances de cette méthode ont montré une sensibilité de 87 %, une spécificité de 95.6 %, une valeur prédictive positive de 72.7 % et une valeur prédictive négative de 91.6 %.

Compte-tenu de la sensibilité et de la valeur prédictive acceptables, cette méthode peut être proposée comme une alternative au diagnostic des infections génitales à *C. trachomatis* dans une population à risque élevé d'infections sexuellement transmissibles.

Mots clés : immunoglobuline A - *Chlamydia trachomatis*- Détection endocervical

Detection of endocervical anti-*Chlamydia trachomatis* immunoglobulin A from women with discharge in Abidjan - Côte d'Ivoire

BANKOLE. H. S. ; FAYE-KETTE H ; WASSOUMBOU S. ; KACOU-N'DOUBA A. ; KOUASSI-M'BENGUE A. ; BOUZID S. A.; DOSSO M.

Unité des Agents des Infections Sexuellement Transmissibles, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01.

Summary

The aim of this study was to assess chlamydial diagnosis by detection of anti-*Chlamydia trachomatis* immunoglobulin A in women's genital secretions in Abidjan.

Endocervical swabs were collected in phosphate buffered saline (PBS) at Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, from 100 women sexually active and who presented vaginal discharge. The swabs were centrifuged. The supernatants were tested for cervical anti-*Chlamydia trachomatis* immunoglobulin A using indirect immunofluorescence. *Chlamydia trachomatis* elementary bodies were detected in all pellets by direct fluorescent antibodies test.

Using direct fluorescent antibodies test (DFA) as reference, detection of *C. trachomatis* cervical IgA had a sensitivity of 87 %, specificity of 95.6 %, predictive positive value of 72.7 % and predictive negative value of 91.6 %.

The sensitivity and the predictive positive value of this method were acceptable. So this method can be used as a alternative method for *C. trachomatis* detection on population where the risk of acquisition of sexual transmitted infection agents is high.

Key words : Immunoglobulin A - *Chlamydia trachomatis* – Cervical detection.

INTRODUCTION

Comme ailleurs dans le monde, l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis* constitue en Côte d'Ivoire aussi, un problème majeur de santé publique. Avec une prévalence estimée à 9% chez les femmes asymptomatiques et à 30% chez les femmes présentant une cervicite (1, 3, 9), l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis* conduit dans sa chronicité à des conséquences redoutables que sont les grossesses extra-utérines et la stérilité (8, 10, 16, 17).

L'absence en général de signes cliniques spécifiques de l'infection (6) et le nombre important des cas d'infections asymptomatiques rendent le diagnostic clinique de la maladie difficile.

Dans ce contexte seule la détection des personnes infectées, dans le cadre d'un programme de santé préventive, constitue le moyen de lutte le plus efficace contre l'infection. Or aujourd'hui, le problème fondamental reste le choix du test de détection biologique de la bactérie dans les pays à moyens limités comme c'est le cas de la Côte d'Ivoire. En effet, la méthode utilisant l'amplification génique qui tend à devenir la méthode de référence, n'est pas réalisable en raison de son coût très élevé. L'isolement par culture cellulaire est très lourd et requiert un temps long pour le résultat. Des techniques de détection immuno-enzymatique de la bactérie sont disponibles mais leur faible sensibilité et surtout leur incapacité à être utilisées pour de petits nombres de prélèvements limitent leur emploi. Enfin les tests sérologiques sont d'interprétation délicate.

La recherche alors d'une méthode de diagnostic sûre, rapide, simple et accessible de l'infection est manifeste (4). Certains auteurs, notamment McComb et coll.(7) d'une part, Brunham et coll.(5) d'autre part ont noté non seulement la présence d'immunoglobulines anti-*Chlamydia trachomatis* dans les sécrétions génitales des patientes infectées mais surtout une très bonne corrélation entre ces immunoglobulines et la détection de la bactérie par d'autres méthodes.

La présente étude a pour objectif de détecter les immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans l'endocol afin de situer leur intérêt dans le diagnostic de la chlamydie génitale chez la femme à Abidjan.

MATERIEL ET METHODES

Patientes : Au cours d'une étude d'essai diagnostique comparatif de performance, nous avons enrôlé 100 femmes en âge d'activité génitale et fréquentant l'Institut Pasteur pour raison de recherche d'étiologie d'écoulement génital. L'âge moyen des femmes était 33 ans (15 ans à 51 ans). Pour prendre part à cette étude il ne fallait pas être sous antibiothérapie depuis au moins 15 jours ; de même, ne pas avoir eu de rapport sexuel 72 heures avant et ne pas avoir fait sa toilette intime le jour du prélèvement.

Les prélèvements endocervicaux ont été réalisés sous spéculum non lubrifié, à l'aide d'écouvillons abrasifs de type « bactopick » et déchargés dans 0.5 ml de tampon phosphate salin (PBS) puis conservés à -70°C jusqu'à la réalisation des tests. Parallèlement, des prélèvements ont été réalisés au niveau du cul de sac et de l'endocol au moyen d'écouvillons coton stériles pour rechercher les autres agents courants des infections sexuellement transmissibles à l'état frais ou après la coloration de Gram.

Détection des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* : Les prélèvements réalisés en tampon phosphate salin (PBS) ont été centrifugés et les surnageants ont été utilisés pour détecter les immunoglobulines A et les immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis*. En effet un volume de 20 μl de surnageant a été déposé sur le spot d'une lame infectée par *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (Biomérieux) puis incubé 30 minutes à 37°C en chambre humide. La révélation a été réalisée au moyen d'un conjugué marqué à la fluorescéine. Le seuil de positivité était de 5 particules.

Détection d'antigène chlamydien par immunofluorescence directe : Les corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* ont été recherchés chez toutes les patientes par immunofluorescence directe.

Des frottis ont été réalisés à partir des culots obtenus après centrifugation des prélèvements endocervicaux faits au bactopick dans du tampon phosphate salin (PBS). Les frottis ainsi confectionnés ont été mis au contact d'une solution d'anticorps monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* du laboratoire Kallestad Diagnostics. Après une incubation de 15 minutes en chambre humide à la température ambiante, les particules élémentaires ont été recherchées au microscope à fluorescence au grossissement x 40 .

Détection des autres agents d'infections sexuellement transmissibles : la détection des autres agents d'infections sexuellement transmissibles s'est limitée à l'examen microscopique direct. Les prélèvements réalisés au moyen d'écouvillons coton au niveau de l'endocol et du cul de sac ont été examinés au microscope optique à l'état frais et après coloration de Gram.

Analyse statistique : Au plan statistique l'analyse des données a été réalisée à l'aide de la version 6 Epi Info de CDC Atlanta. L'analyse statistique a été interprétée au seuil de significativité correspondant à un risque de 5 %.

RESULTATS

Dans la population d'étude, les prévalences des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* et des immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis* étaient respectivement 11 % et 54 % contre 8 % pour les corps élémentaires par immunofluorescence directe.

Utilisant l'immunofluorescence directe comme méthode de référence, les performances de la détection des immunoglobulines A anti- *Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements endocervicaux avaient donné respectivement sensibilité 87 %, spécificité 95.6 %, valeur prédictive positive 72.7 % et valeur prédictive négative 91.6 % (Tableau I).

Chez les patientes qui avaient des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans leurs prélèvements endocervicaux, 63.6 % (7/11) avaient des particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* détectées par immunofluorescence directe, en association.

Dans les 27.3 % (3/11), nous avons noté la présence simultanée de corps élémentaires, d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* et d'immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis*.

88 % (88/100) des patientes n'avaient ni immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* ni antigène chlamydien dans leurs prélèvements endocervicaux.

Dans la population des femmes qui avaient des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis*, la tranche d'âge de 15 à 24 ans étaient la plus représentée (54.6 %). La cervicite clinique y a été retrouvée dans une proportion de 45.4 % (5/11) contre un seul cas de cervicite biologique (nombre de polynucléaires supérieur à 5 par champ d'observation).

Quelques cas discordants ont été observés. En effet, 36.4 % (4/11) des patientes qui avaient des immunoglobulines A cervicales anti-*Chlamydia trachomatis* ne les avaient pas en association à des particules élémentaires. Inversement 12.5 % (1/8) des patientes qui portaient des particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* n'avaient pas d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans leurs prélèvements.

Enfin les 45.4 % (5/11) des cas d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* n'étaient pas associés à la présence d'immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis*

Par ailleurs, 4 prélèvements endocervicaux contenant des particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* (36.4 %) ont révélé en plus, d'autres agents d'infections sexuellement transmissibles mis en évidence à l'examen microscopique direct à l'état frais ou après la coloration de Gram. Il s'agit de : *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* et *Gardenerella vaginalis*).

DISCUSSION

Cette étude dont l'objectif essentiel était de situer l'intérêt diagnostique des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements endocervicaux chez la femme à Abidjan, a permis de faire les commentaires suivants :

La prévalence de 11 % d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* retrouvée dans cette étude est inférieure à celle de 19.2 % obtenue par Witkin et coll. (15) en 1997 à New Jersey aux Etats Unis dans une population de 167 femmes enceintes. Elle est par contre supérieure à celle de 5.8 % signalée par Thejls et coll. (13) qui eux, avaient travaillé également sur une population de femmes enceintes mais une population de taille plus grande (1078 personnes) en Suisse en 1995.

La forte prévalence de 54 % observée pour les immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis* pourrait être le résultat d'une cicatrice sérologique locale, nombreuses femmes de notre population d'étude ayant été probablement en contact avec la bactérie. Il pourrait également s'agir des immunoglobulines induites par d'autres espèces de *Chlamydia* notamment *Chlamydia psittaci* et *Chlamydia pneumoniae*, qui présentent des communautés antigéniques avec *Chlamydia trachomatis* (4, 9). La spécificité de 47.8 % et la valeur prédictive positive de 11 % obtenues pour la recherche de cette catégorie d'immunoglobulines reflèterait surtout cette deuxième situation. Un titrage et une identification assez poussée de ces anticorps nous auraient situés sur l'une ou l'autre de ces deux éventualités.

La corrélation entre la présence des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* et des particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* a été surtout observée dans la tranche d'âge de 15 à 24 ans. Ce résultat corrobore celui de Thejls et coll. (13). Sur les 11 femmes qui avaient des immunoglobulines A sécrétoires, 7 (63.6 %) avaient été concernées par cette observation. Nombreux auteurs avaient indiqué une corrélation entre les immunoglobulines A sécrétoires et l'infection. En effet, Thierry et coll. (14) avaient démontré que la présence des immunoglobulines au niveau vaginal était le témoin d'une infection active qu'un moyen de

uense anti-intectieux. De même, Barguelli et coll. (2) avaient signalé que la présence des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* corrélait de façon significative avec une infection haute telle une salpingite ou une péri hépatite. Enfin Tanikawa (12) avaient trouvé au Japon que les 47.1 % des femmes stériles par obstruction tubaire due à la chlamydie sexuelle, portaient des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis*.

La présence d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* non en association avec des immunoglobulines totales anti-*Chlamydia trachomatis* observée, pourrait traduire une chlamydie débutante, surtout que cette situation a été observée avec des femmes jeunes et qui n'avaient présenté ni cervicite clinique ni cervicite biologique.

Dans les cas d'immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* non en association avec l'antigène chlamydien, il pourrait s'agir soit d'un cas de guérison récente non suivie encore de l'affaissement du taux des immunoglobulines A, soit d'une infection haute ne pouvant pas induire la synthèse des immunoglobulines au niveau cervical (9). Une étude de la cinétique de ces immunoglobulines auraient permis de confirmer l'une ou l'autre de ces deux alternatives.

La sensibilité de 87.5 % obtenue était moins élevée que celle de Witkin et coll. (15) qui eux, avaient utilisé comme référence une méthode immunoenzymatique et avaient trouvé 95.7 %.

Ces résultats reposent le problème de sensibilité des tests utilisés en général pour le diagnostic biologique de la chlamydie sexuelle comme l'ont déjà évoqué Bianchi et coll (3).

Dans cette étude la cervicite a été moins remarquée en association (cervicite clinique 45.4 % et cervicite biologique 9.1 %). Cette situation est liée au caractère asymptomatique observé le plus souvent dans les infections génitales à *Chlamydia trachomatis*. Enfin, l'association de particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* à d'autres germes des vaginites et / ou des vaginoses n'a nullement entravé l'induction des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis*; ce qui prouve le caractère discriminant de ces immunoglobulines et par conséquent leur pouvoir à poser le diagnostic de la chlamydie sexuelle dans une infection mixte.

CONCLUSION

Au terme de cette étude, la prévalence de la chlamydie génitale sur la base des immunoglobulines A sécrétées a été évaluée à 11 %. La méthode a montré une sensibilité de 87 %, une spécificité de 95 %, une valeur prédictive positive de 72.7 % et une valeur prédictive négative de 91.6 %. Compte-tenu de sa sensibilité et de sa valeur prédictive positive faible, les laboratoires pourraient faire recours à cette méthode en cas de populations à risque élevé d'infections sexuellement transmissibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - BANKOLE H. S., FAYE-KETTE H., LARUCHE G., DABIS F., WELFFENS-EKRA C., DOSSO M.

Etude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomatis* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan. *Bull Soc Pathol Exot* 2001 ; **94**, 3 : 235-238.

2 - BARGUELLI F., FEKI S., AMOR A.

Intérêt de la recherche des anticorps spécifiques IgA et IgM dans les infections à *Chlamydia trachomatis* de l'adulte. *La Tunisie Médicale* 1993 ; **71**, 4 : 205-208.

3 - BIANCHI A., DE BARBEYRAC B., BEBEAR C., ALONSO J. M.

Etude comparative de la sensibilité de 29 trousseaux de diagnostic direct des infections à *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'agence du médicament. *Rev. Franc. des Labo.* 1998 ; **306** : 47-52.

4 -BIENDO M., ORFILA J.

Sérodiagnostic de *Chlamydia trachomatis* et de *Chlamydia pneumoniae* : évaluation par comparaison de deux méthodes : microimmunofluorescence et ELISA étude de 250 sérums congolais. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1994 ; **87**, 2 : 81-84.

5 – BRUNHAM R. C., MARTIN D. H., KUO C. C., WANG S. P., STEVENS C. E., HUBBARD T., HOLMES K. K.

Cellular immune responses during uncomplicated genital infection with *Chlamydia trachomatis* in humans. *Infect. Immun.* 1981; **34** : 98-104.

6 – CATES W., WASSERHELT J. N.

Genital chlamydial infections : epidemiology and reproductive sequelae. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; **164** : 1771-1781.

7- McCOMB D. E., NICHOLS R. L., SEMINE D. Z., EVRARD J. R., ALPERT S., CROCKETT V. A., ROSNER B., ZINNER S. H., McCORMACK W. M.

Chlamydia trachomatis in women : antibody in cervical secretions as a possible indicator of genital infection. *J. Infect. Dis.* 1979; **139** : 628-633.

8 –McGREGOR J. A., FRENCH J. I.

Chlamydia trachomatis infection in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; **164** : 1782-1789.

9- PATEL H. C., GOH B. T., VISWALINGAM N. D., TREHARNE J. D.

Interpretation of *Chlamydia trachomatis* antibody response in chlamydial oculogenital infection. *Genitourin. Med.* 1995 ; **71** : 94-97.

**10- RYAN G. M., ABDELLA T. N., McNEELEY S. G., BASELSKI V. S.,
DRUMMOND D. E.**

Chlamydia trachomatis infection in pregnancy and effect of treatment on outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990 ; **162** : 34-39.

**11-SANON S., GERSHY-DAMET G. M., M'BOUP S., KOFFI K., SORO B. N.,
LECORRE M., FAYE H., DOSSO M.**

Prévalence de *Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements génitaux à Abidjan. *Bull. Soc. Path. Exo.* 1992 ; **85** : 209-211.

12 -TANIKAWA M., HARADA T., KATAGIRI C., TERAKAWA N.

Chlamydia trachomatis antibody titres by enzyme-linked immunosorbent assay are useful in predicting severity of adnexal adhesion. *Human reproduction* 1996 ; **11**, 11 :2418-2421.

13 -THEJLS H., RAHM V. A., GNARPE J.

Diagnostic efficacy of chlamydial antibodies in cervical secretions from pregnant women and adolescents girls. *Genitourin Med.* 1995 ; **71** : 370-374.

14 -THIERRY R. C., WURTZ A.

Immunoglobulines A dans le vagin et étude de leur spécificité. *Pathologie Biologie* 1975 ; **23**, 5 : 367-370.

15 -WITKIN S. S., BONGIOVANNI A-M., INGHIS S. R.

Detection of endocervical anti-*Chlamydia trachomatis* immunoglobulin A in pregnant women by a rapid 6-minute enzyme linked immunosorbent assay : comparison with PCR and chlamydial antigen detection methods. *J. Clin. Microbiol.* 1997 ; **7** : 1781-1783.

16- WITKIN S. S., KLIGMAN I., GRIFO A. J., ROSENWAKS Z.

Chlamydia trachomatis detected by polymerase chain reaction in cervices of culture negative women correlates with adverse in vitro fertilization outcome. *J. Infect. Dis.* 1995 ; **171** : 1657-1659.

17- WITKIN S. S., SULTAN K. M., NEAL G. S., JEREINLAS J., GRIFO J. A., ROSENWAKS Z.

Unsuspected *Chlamydia trachomatis* infection and in vitro fertilization outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994 ; **171** : 1208-1214.

Tableau I : Comparaison de la détection des immunoglobulines A, des immunoglobulines totales cervicales et d'antigène de *Chlamydia trachomatis*

Test	I F D		Se	Sp	VPP	VPN
	Vrais positifs (n = 8)	Vrais négatifs (n = 92)				
Ig A (n = 11)	7	4	87.5%	95.6%	72.7%	91.6%
Ig Totale (n = 54)	6	48	75%	47.8%	11.1%	95.6%

Ig : immunoglobuline Se : sensibilité Sp : spécificité VPP : valeur prédictive positive VPN : valeur prédictive négative

Diagnostic de l'infection génital à *Chlamydia trachomatis* par la coloration de Papanicolaou dans les sécrétions génitales de la femme à Abidjan – Côte d'Ivoire.

BANKOLE H. S.¹; FAYE-KETTE H.¹ ; ADO-MENSAH I.² ; KONAN K.²; M'BENGUE-KOUASSI A. ; ACHO Y. B.¹; BOUZID S.¹; DOSSO M.¹

1- Unité des Agents des Infections Sexuellement Transmissibles, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

2- Laboratoire d'Histo-cyto-embryo-génétique, Unité de Formation et de Recherche des sciences médicales d'Abidjan, Côte d'Ivoire.

Correspondance :

Mme FAYE-KETTE Hortense
01 BP 1953 Abidjan 01
Tél : (225) 07-094-224
Fax : (225) 22-487-405
E-mail : fayeket@yahoo.fr
Abidjan / Côte d'Ivoire

Résumé

Cette étude avait pour objectif d'estimer l'efficacité de la coloration de Papanicolaou par rapport à l'immunofluorescence directe à détecter *Chlamydia trachomatis* dans les sécrétions génitales des femmes à Abidjan.

Des frottis endocervicaux de 107 femmes sexuellement actives et fréquentant l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour raison de recherche d'étiologie d'infections sexuellement transmissibles, ont été colorés suivant la méthode de Papanicolaou. Les anomalies évocatrices de l'infection à *Chlamydia trachomatis* ont été révélées au microscope optique.

Parallèlement, les particules élémentaires de *Chlamydia trachomatis* ont été recherchées par immunofluorescence directe dans tous les prélèvements endocervicaux.

Le taux de prévalence de la chlamydirose génitale dans cette population par immunofluorescence directe était 37.4 % et le taux de succès de la coloration de Papanicolaou 7.5 %. Les performances de cette méthode s'estimaient à 7.5 %, 98.5 %, 75 % et 64.1 % respectivement pour la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative.

Ces résultats montrent que la méthode présente une très bonne spécificité mais manque de sensibilité pour le diagnostic de la chlamydirose. Cette méthode ne peut donc être recommandée comme méthode de détection des infections à *C. trachomatis* même dans les populations où le risque d'acquisition des agents des infections sexuellement transmissibles est élevé.

Mots clés : Evaluation - Coloration de Papanicolaou – Infection à *Chlamydia trachomatis*.

**Detection of chlamydial genital infections with the Papanicolaou-stained cervical
cytological smears on women with vaginal discharge
in Abidjan – Côte d'Ivoire**

Summary

Our objective was to compare the efficacy of using Papanicolaou (PAP) stained cervical cytological smears with a standardized direct fluorescent antibodies (DFA) test for detection of *Chlamydia trachomatis* genital infection on women with genital secretions.

Cervical smears were performed from one hundred and seven sexually active women, attending our center for diagnosis of sexually transmitted diseases agents. The smears were stained according to Papanicolaou method and the cytological abnormalities compatible with *Chlamydia trachomatis* related infection were revealed through light microscope. *Chlamydia trachomatis* elementary bodies were detected by direct fluorescent antibodies test in all endocervical swabs.

The genital chlamydial infection rate in that population using direct fluorescent antibodies test was 37.4 % and the success rate of Papanicolaou stained cervical cytological smears was 7.5 %. The method's performances were : sensitivity 7.5 %, specificity 98.5 %, positive predictive value 75 % and negative predictive value 64.1 %.

Those results demonstrate a very good specificity of Papanicolaou stained cervical cytological smears compare to DFA for *Chlamydia trachomatis* related infection diagnosis. Despite his low sensitivity, this method can not be used to detect *Chlamydia trachomatis* in populations in particularly where the risk of sexually transmitted infections acquisition are high.

Key words : Evaluation - Coloration de Papanicolaou – *Chlamydia trachomatis* infection

INTRODUCTION

L'écoulement génital chez la femme constitue l'un des motifs les plus fréquents de consultations en gynécologie. Les agents microbiens les plus souvent rencontrés sont ceux des cervicites et vaginites (*Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*), mais aussi ceux des vaginoses (*Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*).

En Côte d'Ivoire, les praticiens de ces consultations utilisent l'approche syndromique pour le traitement de cette pathologie. Cette approche est généralement basée sur l'aspect macroscopique des sécrétions génitales. Des échecs de traitement sont souvent observés surtout lorsque les algorithmes de traitement appliqués ne tiennent pas compte de la prévalence observée des différents agents de la pathologie.

Aujourd'hui, avec la fréquence des infections mixtes, un diagnostic microbiologique est nécessaire en vue d'un traitement approprié et moins coûteux.

Parallèlement au traitement appliqué aux patientes présentant un écoulement génital, les praticiens des consultations de gynécologie réalisent plus souvent des frottis cervico-vaginaux notamment en cas d'exocervicite ; lesquels frottis sont destinés à la recherche d'une dysplasie cervicale après coloration de Papanicolaou en cytologie.

Le coût financier des examens de laboratoire serait réduit si les frottis ainsi colorés, pouvaient également permettre le diagnostic microbiologique des agents fréquents d'infections sexuellement transmissibles notamment celui du *Chlamydia trachomatis* qui est fréquemment retrouvé dans les infections génitales à Abidjan (Côte d'Ivoire) (1, 9).

C'est la raison de la présente étude, qui a pour but de comparer l'utilisation de la coloration de Papanicolaou à l'utilisation de l'immunofluorescence directe pour la détection de *Chlamydia trachomatis* dans les sécrétions endocervicales.

MATERIEL ET METHODES

Patientes : dans une étude d'essai diagnostique comparatif de performance, nous avons enrôlé 107 femmes en âge d'activité génitale et fréquentant l'Institut Pasteur pour raison de recherche d'étiologie d'infections sexuellement transmissibles. Pour prendre part à cette étude il ne fallait pas être sous antibiothérapie depuis au moins 15 jours ; de même, ne pas avoir eu de rapport sexuel 72 heures avant et ne pas avoir fait sa toilette intime le jour du prélèvement. Les prélèvements endocervicaux ont été réalisés sous spéculum non lubrifié, tout d'abord à l'aide de spatule d'Ayre pour confectionner directement des frottis qui sont par la suite fixés avec une laque à cheveux, ensuite à l'aide d'écouvillons abrasifs de type « bactopick » et déchargés dans 0.5 ml de tampon phosphate salin (PBS) puis conservés à -70°C jusqu'à la réalisation des tests.

Détection de *Chlamydia trachomatis* après coloration de Papanicolaou : Les frottis confectionnés à partir des écouvillons d'Ayre ont été successivement plongés dans des bains d'hématoxyline pour colorer les noyaux, d'orange G et de mélange polychrome pour colorer les cytoplasmes des cellules. Auparavant les frottis ont été réhydratés ou déshydratés avec des solutions alcooliques selon la nature du colorant.

Les anomalies cytologiques à type d'inclusions en « chapeau de gendarme » ou de corps élémentaires entourés par un petit halo clair, évocatrices de l'infection à *Chlamydia trachomatis* ont été recherchées au microscope optique au grossissement x 40.

Détection d'antigène chlamydien par immunofluorescence directe : les corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* ont été recherchés chez toutes les patientes par immunofluorescence directe.

Des frottis ont été réalisés à partir des culots obtenus après centrifugation des prélèvements endocervicaux faits au bactopick dans du tampon phosphate salin (PBS). Les frottis ainsi confectionnés ont été mis au contact d'une solution d'anticorps monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* du laboratoire Kallestad Diagnostics. Après une incubation de 15 minutes en

chambre humide à la température ambiante, les particules élémentaires ont été recherchées au microscope à fluorescence au grossissement x 40.

Analyse statistique : au plan statistique l'analyse des données a été réalisée à l'aide de la version 6 Epi Info de CDC Atlanta. L'analyse statistique a été interprétée au seuil de significativité correspondant à un risque de 5 %.

RESULTATS

Sur les 107 prélèvements endocervicaux, 40 (37.4 %) contenaient des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* révélés à l'immunofluorescence directe. Ce qui confère une prévalence de 37.4 % à l'infection à *Chlamydia trachomatis* dans la population d'étude.

Par rapport à la coloration de Papanicolaou, seuls 7.5 % (3/40) des prélèvements endocervicaux contenant des particules élémentaires, ont présenté des aspects microscopiques compatibles avec une infection à *Chlamydia trachomatis*.

64.5 % (69/107) des prélèvements ont montré des résultats concordants aux deux méthodes. Ces prélèvements sont composés de 3 positifs et de 66 négatifs.

A l'opposé, 35.5 % (38/107) des prélèvements ont eu des résultats contradictoires. En effet, 92.5 % (37/40) des prélèvements positifs à l'immunofluorescence directe ont été négatifs à la coloration de Papanicolaou et 25 % (1/4) des prélèvements positifs à la coloration de Papanicolaou ont été négatifs à l'immunofluorescence directe.

Utilisant l'immunofluorescence directe comme méthode de référence, la coloration de Papanicolaou a montré une sensibilité de 7.5 % une spécificité de 98.5 % une valeur prédictive positive de 75 % et une valeur prédictive négative de 64.1 % (Tableau I).

57 % (31/55) des femmes qui avaient un aspect cytologique inflammatoire de col, portaient des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* révélés par l'immunofluorescence directe contre 18 % (9/52) pour celles dont l'aspect du col était normal (Tableau II).

D'autres agents d'infections sexuellement transmissibles ont été mis en évidence à la coloration de Papanicolaou. Ce sont 10 cas de candidose et 5 cas de vaginose bactérienne.

DISCUSSION

Cette étude dont l'objectif était de comparer l'efficacité de la coloration de Papanicolaou à celle de l'immunofluorescence directe pour la détection de *Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements endocervicaux, a permis de tirer nombreuses observations. Le taux de succès de 7.5 % obtenu dans cette étude pour la coloration de Papanicolaou est inférieur à celui retrouvé par Sonja et coll. (10) d'une part, et à celui retrouvée par Forster et coll. (6) d'autre part. En effet les premiers auteurs sans indiquer la taille de leur population d'étude, avaient rapporté que dans les infections à *Chlamydia trachomatis* reconnues après culture cellulaire, la coloration de Papanicolaou ne montrait des signes en faveur de l'infection à *Chlamydia trachomatis* que dans 20 % des cas. Quant aux seconds auteurs, ils avaient estimé le taux de succès à 13 % sur un effectif de 45 patients reconnus infectés par *Chlamydia trachomatis* grâce à l'utilisation de l'immunofluorescence directe.

La prévalence de 37.4 % retrouvée à l'immunofluorescence directe dans la population d'étude est très élevée et identique à celle retrouvée par Forster et coll. (5). Cela pourrait s'expliquer par l'excellence sensibilité de cette méthode par rapport à la culture, à diagnostiquer l'infection comme l'ont évoqué nombreux auteurs (2, 4, 5, 7, 11).

La méthode de Papanicolaou a montré une sensibilité très faible (7.5 %). Cette situation d'une part, confirme les résultats de Sonja et coll. (10) qui eux, avaient non seulement fait la même observation mais avaient affirmé l'impossibilité d'utiliser cette méthode pour le diagnostic de la chlamydiose génitale et qui par conséquent devait être abandonnée. Yoshio en 1985 (13) avait eu la même attitude lorsqu'il avait affirmé que le cytodagnostic d'infections à *Chlamydia* n'était pas aisé. En effet selon cet auteur, toute inclusion intracytoplasmique ne pouvait être attribuée uniquement aux *Chlamydia*.

D'autre part, elle repose le problème de sensibilité des tests utilisés en général pour le diagnostic biologique des infections génitales à *Chlamydia* comme évoqué par Bianchi et coll. (3)

L'aspect inflammatoire du col a été le signe clinique le plus mis en évidence par la coloration de Papanicolaou. Il a été observé 55 fois et dans 81.82 % (45/55) il a été associé à un germe ou à une association de germes. *Chlamydia trachomatis* a été détecté de façon significative chez les patientes ayant un aspect inflammatoire du col. D'une part ces résultats corroborent ceux de Veena et coll. (12) qui eux, avaient estimé en 1985, l'association « inflammation du col utérin et infection génitale » à 81 %. D'autre part le fort pourcentage observé dans la chlamydie traduit bien le phénomène inflammatoire induit par l'infection à *Chlamydia*, signe indirect aisément mis en évidence par la coloration de Papanicolaou.

Par rapport aux autres agents d'infections sexuellement transmissibles, 15 cas dont 5 (33.3 %) de vaginoses et 10 (66.7 %) de candidoses ont été détectés sur les frottis endocervicaux colorés par la méthode de Papanicolaou. Cela confirme la capacité de cette méthode à poser le diagnostic de ces infections comme l'ont signalé Ronald et coll. (8).

CONCLUSION

Au terme de cette étude, les performances de la méthode de Papanicolaou à diagnostiquer les infections génitales à *Chlamydia trachomatis* ont été évaluées à 7.5 % pour la sensibilité, 98.5 % pour la spécificité, 75 % pour la valeur prédictive positive et 64.1 % pour la valeur prédictive négative. La prévalence de la chlamydie génitale dans la population d'étude a été estimée à 37.4 % par immunofluorescence directe et le taux de succès de la coloration de Papanicolaou à 7.5 %. Si la méthode a présenté une bonne spécificité, elle a par contre manqué de sensibilité. Elle pourrait toutefois constituer une méthode alternative pour le diagnostic de la chlamydie génitale surtout dans les groupes à risque élevé d'infections sexuellement transmissibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - BANKOLE H. S., FAYE-KETTE H., LARUCHE G., DABIS F., WELFFENS-EKRA C., DOSSO M.

Etude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomatis* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan. *Bull Soc Pathol Exot* 2001 ; **94**, 3 : 235-238.

2 -BARNES R. C.

Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989 ; **2** : 119-186.

3 -BIANCHI A., DE BARBEYRAC B., BEBEAR C., ALONSO J. M.

Etude comparative de la sensibilité de 29 trousse de diagnostic direct des infections à *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'agence du médicament. *Rev. Franc. des Labo.* 1998 ; **306** : 47-52.

4 - BLACK C. M.

Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997 ; **10** : 160-184.

5 -DEAN D., FERRERO D., McCARTHY M.

Comparison of performance and cost-effectiveness of direct fluorescent-antibody, ligase chain reaction, and PCR assays for verification of chlamydial enzyme immunoassay results for populations with a low to moderate prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 1998 ; **36** : 94-99.

6-FROSTER G. E., COOKEY I., MUNDAY P. E., RICHMAN P.I., JHA R., COLEMAN D., THOMAS B. J., HAWKINS D. A., EVANS R. T., TAYLOR-ROBINSON D.

Investigation into the value of Papanicolaou stained cervical smears for the diagnosis of chlamydial cervical infection. *J. Clin. Pathol.* 1985 ; **38** : 399-402.

7- MAHONY J. B.

Sensibilité comparée Amplicor TM *Chlamydia trachomatis* / Culture cellulaire ou IFD. Analyses de prélèvements endocervicaux chez 770 femmes. *Journal of Clinical Microbiology* 1994 ; **32** : 2490-2493.

8- RONALD F. L., ELISABETH A. H., PHILIP E. H., JOHN M. D., VIKASH M., CATHY A. L., DAVID T. R.

A comparison of use of Papanicolaou Stained Cervical cytological Smears with Gram-stained Vaginal smears for the diagnosis of bacterial vaginosis in early pregnancy. *Int. J. of STD and AIDS* 1999 ; **10** : 93-97.

9- SANON S., GERSHY-DAMET G. M., M'BOUP S., KOFFI K., SORO B. N., LECORRE M., FAYE H., DOSSO M.

Prévalence de *Chlamydia trachomatis* dans les prélèvements génitaux à Abidjan. *Bull. Soc. Path. Exo.* 1992; **85** : 209-211.

10- SONJA G., JOHN A. N., LUTHER E. L. M., LINDA D., STEVEN W.

Sensitivity and specificity of Papanicolaou-Stained cervical smear in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *Acta. Cyst. J. Clin. Cytopath* 1985 ; **29**, 5 : 671-675.

11-TAYLOR-ROBINSON D.

Tests for infection with *Chlamydia trachomatis*. *International Journal of STD & AIDS* 1996 ;
7 : 19-26.

**12 - VEENA S., MADAN M. G., SATYANARAYANA L., PARASHARI A., ASHOK S.,
CHATTOPADHYA D., SODHANI P.**

Association between Reproductive Tract Infection and Cervical Inflammatory Epithelial
Changes. *Sex. Transm. Dis.* 1995 ; **22**, 1 : 25-30.

13- YOSHIO S.

Cytomorphologic and immunocytochemical studies of *Chlamydia* infections in cervical
smears. *Acta. Cyst. J. Clin. Cytopath* 1985 ; **29**, 5 : 683-691.

Tableau I : Comparaison de la détection des immunoglobulines A, des immunoglobulines totales cervicales et d'antigène de *Chlamydia trachomatis*

Test	I F D		Se	Sp	VPP	VPN
	Positif (n = 40)	Négatif (n = 67)				
Papanicolaou (+) (n = 4)	3	1	7.5%	98.5%	75%	64.1%
Papanicolaou (-) (n = 103)	37	66				

Ig : immunoglobuline Se : sensibilité Sp : spécificité VPP : valeur prédictive positive VPN : valeur prédictive négative

Tableau II : Relation inflammatoire à *Chlamydia trachomatis* par rapport à l'aspect cytologique du col

Aspect cytologique du col	<i>Chlamydia trachomatis</i> par I F D	
	Positifs (n = 40)	Négatifs (n = 67)
Inflammatoire (n = 55)	31 (57%)	24 (43%)
Non inflammatoire (n = 52)	9 (18%)	43 (82%)

P 0.03 (Différence significative)

Résumé

Comme ailleurs dans le monde, l'infection génitale à *Chlamydia trachomatis* constitue également en Côte d'Ivoire, un problème de santé publique. Le présent travail a eu pour but d'améliorer le diagnostic biologique de la chlamydie génitale, ensuite de caractériser les souches de *Chlamydia trachomatis* responsables de l'infection en Côte d'Ivoire.

Des échantillons de sécrétions génitales et de premiers jets d'urines des hommes et des femmes ont été utilisés pour rechercher soit la bactérie (*Chlamydia trachomatis*) soit les immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* endocervicales.

Chlamydia trachomatis a été détecté par la culture sur lignée cellulaire Mac Coy, par l'immunofluorescence directe, par la coloration cytologique de Papanicolaou et par l'amplification génique d'un fragment de 1073 pb du gène *omp1* spécifique de *Chlamydia trachomatis* à partir des amorces CTU et CTL. Les immunoglobulines anti-*Chlamydia trachomatis* ont été détectées par immunofluorescence directe. Après amplification génique, les amplicons ont été soumis à l'action de l'endonucléase *AluI* et les profils observés sur gel d'agarose, ont été identifiés par comparaison à ceux des souches de référence de *Chlamydia trachomatis*.

La culture de *Chlamydia trachomatis* a été effectuée avec un taux de succès de 86,5 pc et les difficultés observées ont été celles de tous laboratoires de culture cellulaire. L'amplification génique a montré des taux de prévalence de 3,9 pc et 14 pc respectivement dans les populations masculine et féminine de l'étude. Ces taux ont été jugés faibles et la raison pourrait avoir été l'absence de cellules ou la présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification. Par rapport aux autres méthodes de diagnostic utilisées, la sensibilité et la spécificité ont été estimées pour :

- la coloration de Papanicolaou à 7,5 pc et 98,5 pc
- la détection des immunoglobulines A anti-*Chlamydia trachomatis* à 87,5 pc et 95,6 pc
- l'utilisation des échantillons de premiers jets d'urines à 100 pc dans les deux cas chez les hommes, à 30 pc et 100 pc chez les femmes.

Quant au génotypage, il a été réalisé avec un taux de réussite de 82,2 pc et a permis de dégager 6 profils génotypiques : G (2,7 pc), D/Đa (8,1 pc), F (10,8 pc), L2/L2a (16,2 pc) et L1 (18,9 pc) ; le dernier profil, le plus prédominant (43,3 pc) n'a pas pu être identifié.

Ces résultats montrent que le diagnostic précoce de la chlamydie génitale et l'isolement de la bactérie sont possibles en Côte d'Ivoire. Les performances des autres méthodes utilisées, indiquent qu'elles peuvent constituer des méthodes alternatives. Enfin, le génotypage a révélé l'hétérogénéité des souches de *Chlamydia trachomatis* en Côte d'Ivoire.

Mots clés : *Chlamydia trachomatis*, méthodes diagnostiques, génotypage.

Summary

As somewhere else in the world, the genital infection to *Chlamydia trachomatis* also constitutes in Côte d'Ivoire, a problem of public health. The present work aimed at improving the biologic diagnosis of the genital chlamydiae, then at characterising the strains of *Chlamydia trachomatis*, responsible for the infection in Côte d'Ivoire.

Samples of genital secretions and rough drafts of urine of the men and the women were used to look for the bacterium (*Chlamydia trachomatis*) or immunoglobulins A anti-*Chlamydia trachomatis* endocervicales.

Chlamydia trachomatis was detected by the culture on cellular lineage Mac Coy, by the direct immunofluorescence, by the cytological staining of Papanicolaou and by specific amplification of a 1073 pb fragment from *omp1* genes of *Chlamydia trachomatis* using primers CTU and CTL. Immunoglobulins anti-*Chlamydia trachomatis* were detected by direct immunofluorescence. After genic amplification, amplicons were subjected to the action of the endonuclease *AluI* and the profiles observed on agarose gel, were identified by comparison to those of *Chlamydia trachomatis* reference strains.

The culture of *Chlamydia trachomatis* was made with a rate of 86.5 pc success and the observed difficulties were those of all laboratories of cellular culture. The genic amplification showed prevalence rates of 3.9 pc and 14 pc respectively in the men and women populations of the study. These rates were considered weak and the reason could have been the absence of cells or inhibitors presence of the amplification reaction. With regard to other used methods of diagnosis, the sensibility and the specificity were estimated for:

- Papanicolaou stain at 7.5 pc and 98.5 pc
- Immunoglobulins A anti-*Chlamydia trachomatis* endocervicales detection at 87.5 pc and 95.6 pc
- Use of the samples of rough drafts of urine at 100 pc in both cases at the men; at 30 pc and 100 pc at the women.

As for the genotyping, it was realised with a rate of 82.2 pc success and allowed to loosen 6 genotypic patterns: G (2.7 pc), D / Đa (8.1 pc), F (10.8 pc), L2 / L2a (16.2 pc) and L1 (18.9 pc); the last pattern, the most prevailing (43.3 pc) was not able to be identified.

These results show that the premature diagnosis of the genital chlamydiae and the isolation of the bacterium are possible in Côte d'Ivoire. The performances of the other used methods, indicate that they can constitute alternative methods. Finally, the genotyping revealed the heterogeneity of the *Chlamydia trachomatis* strains in Côte d'Ivoire.

Key-words: *Chlamydia trachomatis*, diagnostic methods, genotyping.