

Université de Montréal

Activités de la doxycycline sous formes libre et liposomale dans une infection génitale
expérimentale à *Chlamydia trachomatis* chez un modèle murin

par

Lassana Sangaré

Département de Microbiologie-Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D) en Microbiologie-Immunologie

Septembre 1999

© Lassana Sangaré, 1999



W
4
US8
2000
v. 019

Université de Montréal

Activités de la thérapie sont basées sur et personnalisées dans une infection générale
expérimentale à l'échelle de l'organisme chez un modèle animal

par

L'Agence Santé

Département de Microbiologie-Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en Sciences (M.Sc.) en Microbiologie-Immunologie

Septembre 1994

L'Agence Santé, 1994



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Activités de la doxycycline sous formes libre et liposomale dans une infection génitale
expérimentale à *Chlamydia trachomatis* chez un modèle murin

présentée par:

Lassana Sangaré

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:	George Szatmari
Directrice de recherche:	Madeleine Ravaoarinoro
Co-directeur de recherche:	Richard Morisset
Membre du jury:	Édouard Kouassi
Examineur externe:	Dénis Beauchamp

Thèse acceptée le: _____

SOMMAIRE

Chlamydia trachomatis est le principal agent des maladies sexuellement transmissibles (MST) d'étiologies bactériennes dans le monde. Les infections génitales initiales non diagnostiquées et traitées de manière appropriée peuvent se compliquer et provoquer l'infertilité chez l'homme et chez la femme. Les infections chlamydiennes constituent un véritable problème de santé publique dans le monde.

Le but de notre étude, a été d'évaluer l'efficacité d'un antichlamydien liposomal dans une infection génitale à *C. trachomatis* chez un modèle animal sur les bases de données établies *in vitro*, avec en perspective de réduire les doses habituellement administrées aux patients et d'éviter les survenues de complications.

Dans un premier temps, une étude préliminaire *in vitro* nous a permis de déterminer les taux d'encapsulation, la stabilité à la conservation et dans le sérum humain par la méthode de chromatographie de haute performance en phase liquide (HPLC), ainsi que la cytotoxicité de la tétracycline (Tet) et de la doxycycline (Dox) encapsulées dans des liposomes cationiques (CaL), anioniques (AnL) et neutres (NtL). Par la suite, nous avons évalué les activités antichlamydiennes des formulations liposomales dans des cultures de cellules HeLa 229 infectées par la souche L₂/434/Bu de *C. trachomatis*, en comparaison avec celles de leur forme libre. Par ailleurs, nous avons développé un modèle murin d'infection du tractus génital adapté à notre souche chlamydienne.

Les résultats de cette étude préliminaire nous ont montré que les taux d'encapsulation liposomale de la Tet étaient inférieurs à ceux de la Dox et que les formulations liposomales de Dox étaient plus stables à 4°C que celles de la Tet. Les préparations de CaL-Dox et de NtL-Tet étaient les plus stables dans le sérum humain normal et seules les CaL-Dox n'étaient toxiques ni pour les érythrocytes humains normaux, ni pour les cellules HeLa 229 en culture. Les formulations liposomales ont montré de meilleures activités antichlamydiennes que leur forme libre: les inhibitions de la croissance *in vitro* de *C. trachomatis* par les formulations liposomales de Tet et de Dox étaient 3 à 10 fois et 2 à 6 fois supérieures à celles par la Tet et la Dox libres respectivement.

Les analyses de ces différentes caractéristiques des formulations liposomales de Tet et de Dox ont montré que la préparation liposomale de CaL-Dox réunissait les meilleurs atouts pour son utilisation dans l'étude *in vivo*.

Pour le développement du modèle animal expérimental d'infection ascendante du tractus génital, nous avons inoculé par voie vaginale, $1,2 \times 10^5$ unités formant des inclusions de *C. trachomatis* L₂/434/Bu à des souris CF-1 femelles prétraitées à la progestérone. Deux jours après l'inoculation, les corps chlamydiens viables pouvaient être détectés dans des cultures d'écouvillonnages cervico-vaginaux de souris pendant plus de 7 semaines, démontrant ainsi et pour la première fois, la sensibilité de cette lignée de souris à la souche chlamydienne utilisée. Lorsque l'infection devenait inapparente, l'injection de cortisone aux animaux pouvait permettre de détecter les inclusions chlamydiennes en culture cellulaire. Les lésions histologiques au niveau des appareils génitaux ainsi que les élévations de titres des anticorps (Ac) sériques totaux anti-chlamydiens, étaient comparables à celles survenant chez les humains.

Dans la deuxième partie de notre étude nous avons évalué l'efficacité thérapeutique des CaL-Dox dans le modèle murin qui a été développé. Les souris infectées ont été réparties en 4 groupes de traitement et un groupe de témoins positifs d'infection. Des souris non infectées ont servi de témoins négatifs. L'inhibition de la croissance chlamydienne *in vitro* par les CaL-Dox ayant été 2 fois supérieures à celle de la Dox libre, nous avons instauré un régime de 3 doses de CaL-Dox pour vérifier cette efficacité thérapeutique potentielle. Les 4 groupes de souris à traiter ont été soumis à des régimes de 7 et de 3 doses de Dox (7 Dox, 3 Dox) ou de CaL-Dox (7 CaL-Dox, 3 CaL-Dox). Le cours de l'infection et de l'efficacité des différents régimes de traitement ont été suivis par des cultures d'écouvillonnages cervico-vaginaux, le titrage des anticorps sériques totaux et des examens de coupes histologiques des appareils génitaux recueillis à diverses périodes. Sept semaines après l'infection, les souris non sacrifiées ont reçu chacune, 6 doses consécutives de cortisone (125 mg/kg de poids corporel/j); 2 jours après la dernière injection de cortisone, toutes ces souris ont été sacrifiées.

Les résultats ont montré que les taux de guérisons bactériologiques obtenus avec les régimes de 7 doses étaient plus importants que ceux fournis par les doses réduites. Cependant, ni les 3 doses, ni les 7 doses de la formulation liposomale n'ont produit des taux de guérisons bactériologiques statistiquement supérieurs à celui des 7 doses de la Dox libre: les taux étaient comparables entre les régimes de 7 doses de Dox et de CaL-Dox et tous deux étaient plus efficaces que les doses réduites. Avec ou sans corticothérapie, les titres moyens des Ac anti-chlamydiens ainsi que les lésions

histopathologiques ont été de moindre importance chez les souris soumises au régime de 7 CaL-Dox que chez celles de tous les autres régimes. La gravité des infections chlamydiennes étant liée à l'importance des lésions immunopathologiques, dans cette étude nous avons démontré que l'administration des CaL-Dox permettait de réduire de manière significative les survenues de lésions histopathologiques.

L'approfondissement de l'évaluation du potentiel thérapeutique de ces formulations liposomales d'antibiotiques pourrait être une contribution majeure dans la lutte contre les infections chlamydiennes et partant, dans la limitation de leurs implications socio-économiques.

Mots - clés: *Chlamydia trachomatis*, liposomes, tétracyclines, infection expérimentale

TABLE DES MATIÈRES

	Page
PAGE DE TITRE.....	ii
IDENTIFICATION DU JURY.....	iii
SOMMAIRE.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
DÉDICACES.....	xix
REMERCIEMENTS.....	xx
PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1. LES TÉTRACYCLINES.....	5
1.1 Introduction.....	5
1.2 Structures chimiques des tétracyclines.....	6
1.3 Transport des tétracyclines à l'intérieur des cellules eucaryotes et des bactéries.....	8
1.3.1 Pénétration et accumulation dans les cellules eucaryotes	8
1.3.2 Pénétration dans les bactéries.....	11
1.4 Spectre antibactérien.....	14
1.5 Mécanismes d'action	15
1.6 Résistance des bactéries aux tétracyclines	15
1.6.1 Mécanismes de résistance aux tétracyclines	16
1.6.2 Déterminants génétiques de la résistance aux tétracyclines	18
1.7 Pharmacologie de la Tétracycline et de la doxycycline	20
1.7.1 Absorption	20

1.7.2	Distribution	21
1.7.3	Métabolisme et excrétion	21
1.8	Utilisations thérapeutiques	22
1.8.1	Dans les infections urogénitales	22
1.8.2	Dans les infections respiratoires	23
1.8.3	Dans les infections gastrointestinales.....	23
1.8.4	Autres indications	23
1.9	Effets indésirables et toxicité	23
1.9.1	Troubles digestifs	23
1.9.2	Réactions d'hypersensibilité cutanée	24
1.9.3	Anomalies osseuses et dentaires	24
1.9.4	Troubles rénaux	24
1.9.5	Troubles au niveau du système nerveux	25
1.9.6	Autres effets indésirables et toxiques	25
1.10	Interactions médicamenteuses	25
1.11	Conclusion	26
2.	LES LIPOSOMES	26
2.1	Introduction	26
2.1.1	Définition	27
2.1.2	Nomenclature des liposomes.....	27
2.2	Préparation des liposomes	29
2.2.1	Lipides utilisés dans la préparation des liposomes	29
2.2.2	Méthodes de préparation des liposomes	30
2.2.3	Caractérisation des liposomes	32
2.3	Stabilité des liposomes	33
2.3.1	Problèmes de stabilité chimique	34
2.3.2	Problèmes de stabilité physique	34
2.4	Pharmacocinétique des liposomes	35
2.4.1	Interaction liposomes-cellules	35
2.4.2	Pharmacocinétique selon les voies d'administration	36

2.5	Toxicité des liposomes	39
2.5.1	<i>In vitro</i>	39
2.5.1	<i>In vivo</i>	40
2.6	Applications cliniques des liposomes	41
2.6.1	Dans le traitement et la prévention des maladies infectieuses	41
2.6.2	Autres applications	53
2.7	Conclusion	53
3.	CHLAMYDIA TRACHOMATIS	54
3.1	Biologie	54
3.1.1	Taxonomie	54
3.1.2	Morphologie et ultrastructure des <i>Chlamydia</i>	56
3.1.3	Structures antigéniques de <i>C. trachomatis</i>	65
3.1.4	Cycle de développement	70
3.2	Pouvoir pathogène de <i>Chlamydia trachomatis</i>	82
3.2.1	Pathogénèse.....	82
3.2.2	Infections urogénitales: maladies sexuellement transmissibles (MST)	85
3.2.3	Infections néonatales	88
3.2.4	Le trachome et les infections cardiovasculaires	88
3.3	Épidémiologie	88
3.3.1	Incidences et prévalences des MST chlamydiennes	89
3.3.2	Incidences et prévalences des infections oculaires	93
3.4	Diagnostic au laboratoire des infections urogénitales chlamydiennes	94
3.4.1	Prélèvements	94
3.4.2	Diagnostic direct	96
3.4.3	Diagnostic indirect	101
3.5	Traitement des infections génitales chlamydiennes	103
3.5.1	Traitement curatif	103
3.5.2	Prévention	107
3.6	Conclusion	107
	BUT DU PROJET	108

DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS	111
CHAPITRE 3, ARTICLE 1	111
Incorporation rates, stabilities, cytotoxicities and release of liposomal tetracycline and doxycycline in human serum	111
Summary	112
Introduction	112
Material and methods	112
Results	114
Discussion	115
Acknowledgments	116
References	116
Table and figure legends	117
Table	118
Figure	119
CHAPITRE 4, ARTICLE 2	120
In vitro antichlamydial activities of free and liposomal tetracycline and doxycycline	120
Summary	121
Introduction	121
Materials and methods	122
Results	126
Discussion	126
Acknowledgments.....	128
References.....	128
Table legend	130
Table	131
CHAPITRE 5, ARTICLE 3	132
Inhibition in-vitro de la croissance de <i>Chlamydia trachomatis</i> par des cyclines encapsulées dans les liposomes	132
Introduction	133

Matériels et méthodes	133
Résultats	134
Discussion	135
Références	136
Légendes des tableaux	137
Résumé	137
Summary	138
Tableau I	139
Tableau II	140
CHAPITRE 6, ARTICLE 4	141
Effects of cationic liposome-encapsulated doxycycline on experimental <i>Chlamydia trachomatis</i> genital infection in mice	141
Summary	142
Introduction	143
Materials and methods	144
Results	146
Discussion	148
Acknowledgments	151
References	151
Table and figure legends	153
Table I	155
Table II	156
Figure 1	157
Figure 2	158
Figure 3	159
Figure 4	160
TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	161
CHAPITRE 7, DISCUSSION GÉNÉRALE	161
CHAPITRE 8, CONCLUSION	188
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	190

LISTE DES TABLEAUX

	Page
PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE	
DE LA LITTÉRATURE	
CHAPITRE 2:REVUE DE LA LITTÉRATURE	
Tableau I: Caractéristiques des différentes espèces de <i>Chlamydia</i>	55
Tableau II: Composition en phospholipides des membranes externes des sérotypes F et L ₂ de <i>Chlamydia trachomatis</i> et des cellules HeLa 229	63
Tableau III: Caractéristiques des principaux antigènes de <i>C. trachomatis</i>	66
Tableau IV: Estimation mondiale des incidences des infections génitales à <i>C. trachomatis</i> chez les personnes âgées de 15 à 49 ans en 1995	90
Tableau V: Facteurs influençant l'épidémiologie des MST chlamydiennes	92
Tableau VI: Exemples de schémas thérapeutiques pour le traitement des infections génitales chlamydiennes	104
DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS	
CHAPITRE 3, ARTICLE 1	
Table: Cytotoxicity of tetracycline- and doxycycline-containing liposomes	118
CHAPITRE 4, ARTICLE 2	
Table I: In-vitro anti-chlamydial activities of free and liposome-encapsulated tetracycline and doxycycline	131
CHAPITRE 5, ARTICLE 3	
Tableau I: Activités des antichlamydiens	139
Tableau II: Influences des concentrations des antibiotiques testés sur l'inhibition de la croissance chlamydienne <i>in vitro</i>	140
CHAPITRE 6, ARTICLE 4	
Table I: Total serological antichlamydial antibody titers at various periods of sacrifice of positive control and treated mice	155
Table II: Rates of pathological changes in various sites of the genital tract	156

LISTE DES FIGURES

	Page
PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE	
CHAPITRE 2, REVUE DE LA LITTÉRATURE	
Figure 1: Structures des principales tétracyclines utilisées en clinique	7
Figure 2: Schéma du corps élémentaire chlamydien	58
Figure 3: Cycle de développement des <i>Chlamydia</i>	72
DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS	
CHAPITRE 3, ARTICLE 1	
Figure: Kinetics of release of liposome-encapsulated tetracycline and doxycycline into serum	119
CHAPITRE 6, ARTICLE 4	
Figure 1: Sections of mouse vagina	157
Figure 2: Sections of mouse uterus	158
Figure 3: Sections of mouse oviduct	159
Figure 4: Section of a normal mouse ovary	160

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Angstrom
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ag	Antigène
AnL, ANL	Liposomes anioniques
AnL-Dox	Doxycycline encapsulée dans les liposomes anioniques
AnL-Tet	Tétracycline encapsulée dans les liposomes anioniques
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATCC:	American type culture collection
ATP:	Adénosine triphosphate
AZT	3'-Azido-3'-deoxythymidine
C	Carbone
°C	Degré celcius
CaL	Liposome cationique
CAL-Tet, CaL-Tet	Tétracycline encapsulée dans les liposomes cationiques
CCM	Chromatographie en couche mince
C/E	Rapport concentration intracellulaire sur la concentration extracellulaire
CE	Corps élémentaires
CI	Corps intermédiaire
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMEC	Complexes de membranes externes chlamydiennes
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CO ₂	Dioxyde de carbone
CR	Corps réticulé
DEAE-dextran	Diéthylaminoéthyl-dextran

DC	Domaine constant
DCP	Dicétylphosphate
DMPC	Dimristoyl phosphatidylcholine
Dox	Doxycycline
DPG	Diphosphatidylglycérol
DPPG	Dipalmitoyl phosphatidylglycérol
DPPE	Dipalmitoyl phosphatidylsérine
DSPC	Distéaoryl phosphatidylcholine
DV	Domaine variable
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimal essential medium
<i>g</i>	Force centrifuge relative
<i>g</i>	gramme
GPIC	Guinea pig inclusion conjonctivitis
GUV	Vésicule géante unilamellaire
<i>h</i>	Heure
HDL	Lipoprotéine plasmatique de haute densité
HLA	Human leukocyte antigen
HPLC	High-performance liquid chromatography
<i>hsp</i>	Heat shock protein
IDO	Indoleamine 2, 3-dioxygénase
IF	Immunofluorescence
<i>ifu</i>	Inclusion forming unit
Ig	Immunoglobuline
<i>im</i>	Intramusculaire
IFN- γ	Interféron gamma
IP	Intrapéritonéale
<i>iv</i>	Intraveineuse
<i>j</i>	Jour
kDa,	Kilodalton
KDO	2-kéto-3-déoxy-octonate
kg	Kilogramme

kpb	kilo paire de bases
L	Litre
LGV	Lymphogranulomatose vénérienne
LPS	Lipopolysaccharide
LSPQ	Laboratoires de Santé Publique du Québec
LUV	Grande vésicule unilamellaire
lysoPC	Lyso phosphatidylcholine
M	Mole
mAc	Anticorps monoclonaux
MAC	<i>Mycobacterium avium- M. cellulare</i>
MBC	Minimum bactericidal concentration
Mda	Mégadalton
µg	Microgramme
mg	Milligramme
MGT	Moyenne géométrique des titres
MIC	Minimum inhibitory concentration
min	Minute
MIF ou micro-IF	Microimmunofluorescence
Mip	Macrophage infectivity potentiator
µL	Microlitre
µm	Micromètre
ml, mL	Millilitre
MLV	Vésicule multilamellaire
µmol, µM	micromole, micromolaire
MOMP	Major outer membrane protein
MoPn	Mouse pneumonitis
MST	Maladies sexuellement transmissibles
MUV	Vésicule unilamellaire de taille moyenne
MVV	Vésicule multivésiculaire
n	Nombre
nm	Nanomètre
NTL	Liposome neutre

NTL-Tet	Tétracycline encapsulée dans les liposomes neutres
NTL-Dox	Doxycycline encapsulée dans les liposomes neutres
OLV	Vésicule oligolamellaires
Omp	Outer membrane protein
OMS	Organisation mondiale de la santé
orf	Open reading frame
PA	Acide phosphatidique
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
p-i	Post inoculation
PID	pelvic inflammatory diseases
PMME	Protéine majeure de la membrane externe
po	Per os
PS	Phosphatidylsérine
REV	Vésicule préparée par évaporation en phase inverse
RFC	Réaction de fixation du complément
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Seconde
SA	Stéarylamine
sc	Sous-cutané
SEM	Standard error mean
SM	Sphingomyéline
SPG	Sucrose-phosphate-acide glutamique
SRE	Système réticulo-endothélial
SUV	Petits vésicules unilamellaires
Tet	Tétracycline
<i>tet</i>	Gène de résistance à la tétracycline
TNF- α	Tumor necrosing factor alpha

ufi	Unité formant inclusion
UV	Ultra violet
vo	Voie orale
v/v	Volume/volume

À ma mère

À mon épouse Pabegwendé Nestorine, à mes frères et sœurs

À mon défunt père, à mes défunts frères et sœur Boubacar Sidik, Yacouba, Sita

Gloire à L'Éternel, Dieu ! À Lui toutes les louanges et merci pour sa grâce

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier de tout cœur la Dre Madeleine Ravaoarinoro, Professeure-adjointe de clinique au Département de Microbiologie-Immunologie à l'Université de Montréal, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, donné l'occasion de réaliser ce travail sous sa direction pour sa grande disponibilité et pour tous les conseils judicieux prodigués tout au long de mon séjour dans le Département de Microbiologie et Infectiologie du Campus Hôtel-Dieu, CHUM. Merci pour toute la confiance que vous avez placée en moi dans la réalisation de ces travaux.

Je voudrais également remercier le Dr Richard Morisset, Professeur à la Faculté de Médecine à l'Université de Montréal pour avoir accepté de co-diriger mes travaux de doctorat.

Je tiens à remercier le Dr George Szatmari et le Dr Édouard Kouassi Professeurs à l'Université de Montréal ainsi que le Dr Denis Beauchamp, Professeur à l'Université Laval pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à l'endroit de mes collègues étudiants du Laboratoire de la Dre M. Ravaoarinoro: Daniel Rivas, Amélie Tsama et Annie Chamberland. Bonne chance et que le Seigneur, L'Éternel, vous guide dans la vie.

Merci à Johanne Lefèbvre du LSPQ, Mme Mireille Fyfe (Département de Biochimie à l'Université de Montréal), Rose-Marie Classens, Monique Benoît, à Sylvie Légault ainsi qu'à tout le personnel technique et administratif du Département de Microbiologie, Hôtel-Dieu, CHUM. Merci à Mme Lise David au Secrétariat du Département de Microbiologie-Immunologie de l'Université de Montréal pour sa constante disponibilité à fournir les bonnes orientations administratives. Que le Seigneur vous bénisse.

Merci au Programme Canadien des Bourses de la Francophonie grâce auquel j'ai pu effectuer mes études doctorales à l'Université de Montréal. Merci au Canada, à l'Université de Montréal et au Campus Hôtel-Dieu, CHUM pour les cadres de travail qui m'ont été fournis

PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION GÉNÉRAL ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infections chlamydiennes comptent parmi les maladies humaines et animales les plus anciennement décrites (Schachter, 1990): *Chlamydia trachomatis*, l'agent du trachome et le principal agent bactérien de maladies sexuellement transmissibles (MST), est un pathogène dont les caractéristiques microbiologiques se situent entre celles des bactéries classiques et celles des virus. Sa caractérisation chez les sujets infectés est restée longtemps limitée à la mise en évidence au microscope optique des inclusions colorées par le Giemsa: il en a résulté un manque d'intérêt relatif des microbiologistes pour ce pathogène. Toutefois, lorsque son isolement est devenu possible sur des œufs embryonnés de poule et surtout dans des cultures cellulaires (Gordon & Quan, 1965; Kuo et al., 1972; T'ang et al., 1957), d'énormes progrès portant sur ses caractères bactériologiques, son épidémiologie, le large spectre des infections dont il est responsable et leur traitement ont pu être accomplis. Les infections à *C. trachomatis* constituent un problème mondial de santé publique qui affecte aussi bien les pays industrialisés que ceux en développement: les chiffres publiés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1998 sur les incidences des MST chez les sujets de 15 à 49 ans dans le monde, plaçaient les infections génitales chlamydiennes en tête de liste des MST bactériennes avec 89,1 millions de cas, devant les 62,2 millions de cas de gonococcies et les 12,2 millions de cas de syphilis (Gerbase et al., 1998). Cependant, il reste à noter que la majorité des infections génitales chlamydiennes sont asymptomatiques tant chez l'homme que chez la femme. En outre, elles ne sont pas de déclaration obligatoire dans tous les pays membres de l'OMS: ces incidences déjà très importantes, sont assurément sous-estimées. À l'instar des autres MST, les catégories de population les plus touchées sont celles qui sont sexuellement actives et le pathogène apparaît désormais comme un facteur majeur favorisant des infections par les virus de l'immunodéficience humaine (Ho and al., 1995; Laga et al., 1994). Dans la plupart des pays où les ressources diagnostiques sont disponibles en routine, les estimations des incidences économiques sont

mal connues; aux États-Unis, la prise en charge économique était évaluée à plus de 2 milliards de dollars par an au cours de cette décennie. Au delà des aspects économiques, il est à considérer l'importance des incidences sociales inhérentes aux complications à long terme des infections génitales chlamydiennes qui se traduisent par des PID (pelvic inflammatory diseases), des grossesses ectopiques, des avortements indésirés et des stérilités secondaires.

Plusieurs décennies après l'isolement de *C. trachomatis*, la réalisation des premiers tests de sensibilités aux antichlamydiens (Gordon & Quan, 1962; Kuo et al., 1977; Ridgway et al., 1976), de nombreux points obscurs persistent et aucune méthodologie standard n'existe ni pour sa culture, ni pour l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques *in vitro* (Ehret & Hudson, 1993).

Récemment, le chromosome de *C. trachomatis* a été cloné et entièrement séquencé (Stephens et al., 1998). Les méthodes de biologie moléculaire ouvrent des avenues sur les analyses de certains détails des structures antigéniques de la bactérie et de la réponse immunitaire de l'hôte au cours de l'infection, laissant ainsi entrevoir des perspectives vaccinales (Bavoil et al., 1996; Rank & Bavoil, 1996; Ward, 1992). Cependant, les antibiotiques dont les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones, restent concrètement les outils thérapeutiques disponibles actuellement (CDC, 1998; Jones, 1991; Mardh & Löwing, 1990; Sanders et al., 1986; Stamm, 1991; Weber & Johnson, 1995): la liste des molécules utilisables va en s'allongeant, mais les problèmes de traitement demeurent également (Ehret & Judson, 1993; Ridgway, 1997; Toomey & Barnes, 1990). Des cas d'échecs thérapeutiques impliquant le non respect des prescriptions par les patients sont largement documentés dans la littérature, mais de toute évidence cette raison ne suffit pas à elle seule pour expliquer tous les insuccès des traitements. Par ailleurs, des cas de résistance d'isolats cliniques du pathogène aux antibiotiques ont été rapportés (Jones et al., 1990; Lefèvre et al., 1997; Mourad et al., 1980) et des mutants de *C. trachomatis* du sérotype L₂ résistants aux fluoroquinolones ont été développés expérimentalement *in vitro* (Dessus-Babus et al., 1998). Les difficultés de manipulations des gènes des *Chlamydia* constituent encore une limite à l'étude des éventuels supports génétiques de ces résistances et de leurs mécanismes d'action.

Pour faire face à l'évolution des bactéries et à leur adaptation aux antibiotiques, il est d'habitude en clinique de développer de nouvelles molécules qui sont dotées de meilleures

propriétés antibactériennes et pharmacologiques. Toutefois, ces procédés sont coûteux et longs à réaliser. À leurs côtés, il existe d'autres possibilités comme l'utilisation des vecteurs de médicaments parmi lesquels figurent les liposomes. Les liposomes sont des vésicules lipidiques de nature biologique dont l'utilisation peut permettre de modifier le devenir d'une drogue dans l'organisme auquel ils sont administrés: ils peuvent protéger le produit encapsulé contre les aléas des liquides biologiques et le véhiculer plus ou moins spécifiquement vers les cellules ou tissus cibles. Ces vecteurs colloïdaux ont trouvé de nombreuses applications expérimentales en infectiologie et depuis quelques années, l'amphotéricine B est commercialisée dans certains pays sous forme liposomale ou sous forme de suspension lipidique pour lutter contre certaines infections fongiques sévères et généralisées (Omri & Ravaoarino, 1998). Les encapsulations d'antibiotiques anti-chlamydiens dans des liposomes ont été rapportées dans deux études dont l'une avait poussé ses objectifs à l'évaluation de l'activité des formulations liposomales sur *C. trachomatis in vitro* (Al-Awadhi et al., 1992; Stuhne-Sekalec et al., 1991). Mais jusqu'à ce jour, aucune évaluation de l'activité d'un antichlamydien liposomal n'avait été réalisée *in vivo*.

Pour parvenir à cette fin, nous avons entrepris d'évaluer les efficacités d'encapsulation dans des liposomes de certains antibiotiques assez peu coûteux et d'usage courant dans le traitement des infections chlamydiennes. *C. trachomatis* est aussi l'agent du trachome, une maladie oculaire responsable de plusieurs millions de cas de cécité dans le monde (Schachter & Dawson, 1990); mais dans l'étude que nous avons menée dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés au spectre d'infections urogénitales dont il est responsable chez la femme. Après la caractérisation *in vitro* des propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et des activités antichlamydiennes des formulations liposomales de Tétracycline et de doxycycline, nous avons entrepris d'évaluer *in vivo* l'efficacité thérapeutique d'une doxycycline liposomale dans un modèle animal d'infection génitale chlamydienne que nous avons développé dans notre laboratoire. Cette étape constitue un préalable fondamental pour l'utilisation d'une nouvelle drogue chez l'humain. Les lésions histopathologiques des parties supérieures du tractus génital dont les manifestations cliniques sont regroupées sous l'expression "maladies inflammatoires pelviennes" ou PID nécessitent souvent des hospitalisations des patients pour permettre de réaliser des traitements mieux suivis (CDC, 1991, 1998). Nous avons pensé que les

antibiotiques encapsulés dans les liposomes pourraient permettre d'améliorer le traitement de ces infections de par la réduction des doses de drogues à administrer et la réduction, voire la suppression des séquelles inhérentes aux complications de l'infection aiguë.

Cette thèse est présentée en trois parties. La première a trait à une revue générale de la littérature qui porte sur les tétracyclines, les liposomes et la biologie, le pouvoir pathogène, l'épidémiologie et le traitement des infections urogénitales causées par *C. trachomatis*. Dans la deuxième partie, nous présentons les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sous formes de manuscrits soumis à des revues scientifiques. Et enfin, la discussion générale de ces résultats et la conclusion générale composent la troisième partie.

CHAPITRE 2: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. LES TÉTRACYCLINES

1.1 INTRODUCTION

Les tétracyclines constituent une grande famille d'antibiotiques de large spectre dont les activités antimicrobiennes sont essentiellement de type bactériostatique. Cette famille compte près de 1000 dérivés naturels et semi-synthétiques dont sept seulement sont couramment utilisés en médecine. La chlortétracycline, première molécule connue de la famille, a été isolée de *Streptomyces aureofaciens* en 1948 par le mycologiste Duggar (1948). L'oxytétracycline a été isolée en 1950 de *Streptomyces rimosus* (Finlay et al., 1950). Bien qu'il existait des possibilités de production de la Tétracycline par fermentation à partir de souches de *S. aureofaciens* (Doerschuk et al., 1956; Minieri et al., 1953), ce dérivé a été le premier à être obtenu par héli-synthèse en 1953 (Boothe et al., 1953; Conover et al., 1953). Sa production a été suivie par celles de nombreux autres produits d'héli-synthèse dont la demeclocycline en 1957, la méthacycline en 1961, la doxycycline en 1966 et la minocycline 1967 (Chopra et al., 1992; Klein & Cunha, 1995; Goldstein, 1988). Les avantages liés au faible coût des tétracyclines, à leurs activités antibactériennes à large spectre et à leur pharmacocinétique ont conduit, pendant plusieurs décennies, à leur utilisation intensive à travers le monde tant en médecine humaine et vétérinaire que dans l'industrie alimentaire (Col & O'Connor, 1987; Kiser et al., 1971; Levy, 1992; Manten, 1968; Speer et al., 1992). L'apparition de résistance aux tétracyclines dans de nombreuses familles bactériennes habituellement sensibles (Chopra et al., 1981; Levy, 1984, 1988), certains effets toxiques et la découverte de molécules plus actives ont considérablement modifié les indications de ces antibiotiques (Goldstein, 1998; Hunter & Hill, 1997; Manten, 1968, 1972; Speer et al., 1992). Plus récemment, d'autres dérivés semi-synthétiques appelés glycylicyclines ont été découverts dans le cadre d'un programme initié en 1988 par les Laboratoires Lederle (Barden et al., 1994; Sum et al., 1994; Tally et al., 1995): ils possèdent des propriétés pharmaco-cinétiques expérimentales améliorées chez la souris (Testa et al., 1995) et des activités plus marquées sur les bactéries de sensibilités réduites ou résistantes aux anciennes tétracyclines (Barden et al., 1994; Sum et al., 1994; Testa et

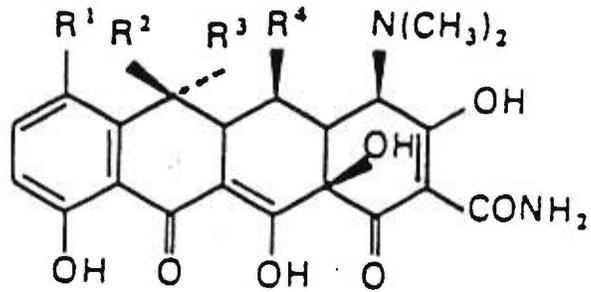
al., 1995). Cependant, ces nouvelles molécules ne sont pas encore prescrites en médecine et les anciens dérivés sont encore très utilisés de nos jours.

1.2 STRUCTURES CHIMIQUES DES TÉTRACYCLINES

La Tétracycline et la doxycycline, comme leurs autres analogues, ont en commun un noyau de naphtacène constitué de quatre cycles hexagonaux accolés (désignés par les lettres D-C-B-A); quel que soit le dérivé, les carbones C1, C10, C11 et C12 ont toujours des substituants oxygénés (Brown & Ireland, 1978; Fourtillan & Lefèbvre, 1980; Goldstein, 1988). Les structures des principales tétracyclines utilisées en clinique figurent dans la Figure 1. Les formules chimiques sont très voisines: la doxycycline et la tétracycline ont la même formule chimique brute. Cependant, les dérivés se distinguent les uns des autres par les substitutions aux niveaux des carbones C5, C6 et C7. La doxycycline se distingue de la Tétracycline par la simple présence d'un groupement hydroxyle (-OH) en C5 à la place de l'hydrogène (-H) de la Tétracycline. Ces substitutions n'apportent pas de variations fondamentales dans l'activité antibactérienne générale des tétracyclines, mais elles suffisent à engendrer des différences considérables entre leurs propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, liposolubilité) et partant, entre leurs propriétés pharmacocinétiques (Brown & Ireland, 1978; Fourtillan & Lefebvre, 1980). Les tétracyclines sont des molécules amphotères qui présentent des caractères acides ou basiques suivant le pH du milieu dans lequel ils se trouvent. L'hydrosolubilité d'une tétracycline va dépendre surtout de la présence de substituants polaires tels que les groupements -OH dans les positions C5 et C6. La densité électronique générée par ces substituants augmente l'hydrosolubilité des dérivés. Les dérivés les moins chargés électriquement sont les moins hydrosolubles. En général, les tétracyclines seront d'autant plus liposolubles qu'elles seront neutres (Fourtillan & Lefèbvre, 1980) et cette neutralité est obtenue au pH dit isoélectrique qui est proche de 5,5. Les affinités des tétracyclines pour les milieux aqueux et lipidiques peuvent être déterminées expérimentalement par les coefficients de partage (K_p), en utilisant le système chloroforme-eau comme modèle. Ce coefficient varie selon le pH et se définit par le K_p qui résulte du rapport de la solubilité de la tétracycline dans le chloroforme (liposolubilité) sur sa solubilité dans l'eau (hydrosolubilité)

À pH compris entre 4 et 8, l'oxytétracycline est le dérivé le moins liposoluble et la minocycline est le composé le plus liposoluble. Entre les deux se situent la Tétracycline

Figure 1: Structure des principales tetracyclines utilisées en clinique (Chopra et al, 1992)



Antibiotic	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Tetracycline	H	CH ₃	OH	H
Oxytetracycline	H	CH ₃	OH	OH
Chlortetracycline	Cl	CH ₃	OH	H
Demethylchlortetracycline	Cl	H	OH	H
Methacycline	H	=CH ₂		OH
Doxycycline	H	CH ₃	H	OH
Minocycline	-N(CH ₃) ₂	H	H	H

qui est elle même moins liposoluble que la doxycycline, le rapport de liposolubilité entre les deux dérivés pouvant être de 1:6 (Fourtillan & Lefebvre, 1980; Saivin & Houin, 1988). Une grande lipophilie d'un dérivé est en faveur de sa bonne pénétration à travers les membranes des cellules eucaryotes (Cunha, 1983; Fourtillan & Lefebvre, 1980; Fourtillan & Saux, 1977, 1978).

1.3 TRANSPORT DES TÉTRACYCLINES À L'INTÉRIEUR DES CELLULES EUCARYOTES ET DES BACTÉRIES

La découverte de bactérie intracellulaire ayant survécu à la phagocytose a conduit à la recherche d'antibiotiques susceptibles de les atteindre au sein de la cellule pour y exercer leur action antibactérienne. La multitude d'expériences réalisées depuis, a utilisé diverses espèces bactériennes, divers types de cellules et d'antibiotiques, avec différentes méthodes d'investigation.

Pour agir contre les bactéries, les tétracyclines doivent franchir les enveloppes de ces micro-organismes et atteindre leurs cibles. Lorsque la bactérie est intracellulaire, les antimicrobiens doivent traverser préalablement les membranes de la cellule hôte avant celles du micro-organisme. Le passage à l'intérieur de la cellule et/ou de la bactérie ne doit pas altérer l'efficacité de l'activité antibactérienne (Maurin & Raoult 1993; Steinberg, 1994; Tulkens 1991; van den Broek 1989).

1.3.1 Pénétration et accumulation dans les cellules eucaryotes

1.3.1.1 Modèles cellulaires *in vitro*

Grâce à des techniques de fluorescence, Du Buy et Showacre (1964) avaient conclu à l'absence de pénétration de la Tétracycline dans les cellules eucaryotes. De nombreux travaux ultérieurs ont démontré le contraire: les tétracyclines, la doxycycline et la Tétracycline en l'occurrence, pénètrent dans une grande variété de cellules d'origines humaine et animale qui ont servi, pour la plupart, à l'étude de la pénétration des tétracyclines dans des cellules:

- cellules du sang périphérique humain: les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, lymphocytes (Gabler, 1991; Maurin & Raoult 1993; Murdoch & Peterson 1991; Park & Dow 1970; Forsgren & Bellahsène 1985).

- macrophages alvéolaires de sujets humains normaux (Hand et *al.*, 1984; Maurin & Raoult 1993) et de fumeurs (Hand et *al.*, 1985) ainsi que des macrophages péritonéaux d'animaux (Maurin & Raoult 1993; Murdoch & Peterson 1991; Najar et *al.*, 1984).
- hématies (Gabler, 1991; Maurin & Raoult 1993; Park & Dow, 1970)
- lignées cellulaires d'origine épithéliale ou sanguine: fibroblastes, macrophages, cellules HeLa, cellules HEP-2 en culture (Brown & Percival, 1978; Chadwick & Mellersh 1987; Maurin & Raoult 1993; Najar et *al.* 1984).
- cellules infectées (Maurin & Raoult 1993; Murdoch & Peterson, 1991). Les tétracyclines figurent parmi les antibiotiques majeurs utilisés contre les pathogènes intracellulaires obligatoires tels les *Chlamydia*.

1.3.1.2 Méthodes d'étude

Il existe plusieurs méthodes d'étude de la pénétration et de la distribution des tétracyclines dans les différents compartiments des cellules humaines et animales (Eltahawy, 1983; Forsgren & Bellahsène, 1985; Maurin & Raoult 1993; Murdoch & Peterson 1991; Steinberg, 1994): les cellules isolées du sang total ou en culture sont mises à incuber dans une solution à pH défini en présence de l'antibiotique à une concentration déterminée. L'antibiotique peut être radiomarké ou non. Les tétracyclines possèdent des propriétés autofluorescentes qui peuvent faciliter leur détection. Au terme de l'incubation, les cellules sont séparées du milieu par centrifugation et lavées éventuellement pour éliminer les traces d'antibiotique non incorporé, mais associé à la fraction cellulaire. Le taux de tétracycline accumulée dans les cellules peut être déterminé par des méthodes microbiologiques, radiologiques, fluorométriques au microscope, de chromatographie de haute performance en phase liquide ou HPLC, etc... Cependant, ces méthodes ont des limites en commun: lors de la séparation de la fraction cellulaire du surnageant, particulièrement avec le lavage, il se produit une diffusion rapide d'antibiotique de la cellule au milieu de suspension. Cet inconvénient peut être partiellement surmonté par l'utilisation d'huile de silicone lors d'une centrifugation en gradient de vitesse (Hand et *al.*, 1985; Murdoch & Peterson, 1991). Mais, il restera toujours des traces de tétracycline associées à la surface des cellules que même le dosage de l'antibiotique dans le milieu extracellulaire ne peut permettre de corriger avec exactitude. Il n'existe pas de milieu

extracellulaire standard pour ces études: leurs différences de composition exercent des influences considérables sur la pénétration des antibiotiques dans les cellules, notamment avec la présence de cations métalliques divalents et/ou de protéines.

La méthode microbiologique est la seule qui permet d'apprécier l'activité antibactérienne des tétracyclines dans ces conditions expérimentales; toutefois, elle nécessite une grande quantité de cellules, elle n'est pas sensible et elle ne mesure que la fraction libre de l'antibiotique mais pas celles liées aux composantes cellulaires, ni celles dénaturées par les enzymes cellulaires (Murdoch & Peterson 1991; van den Broek, 1989). Les méthodes radiologique et de fluorescence permettent de déterminer les localisations cellulaires des antibiotiques, mais les travaux de Park et Dow (1970) ont montré que la fluorescence des tétracyclines dans les hématies peut être masquée par certains constituants cellulaires (Gabler, 1991).

Une autre approche pour l'estimation de la pénétration, de la localisation des tétracyclines et de leur activité intracellulaire consiste à utiliser des phagocytes avec des bactéries internalisées et vivantes (Brown & Percival 1978; Chadwick & Mellersh 1987). L'importance quantitative de la pénétration et de l'accumulation des tétracyclines dans la cellule est exprimée par le rapport de concentration intracellulaire (C) sur la concentration extracellulaire (E): c'est le ratio C/E (Steinberg, 1994). Mais les biais sont nombreux, quelle que soit la méthode utilisée. Pour une même tétracycline, les rapports C/E varient d'un type de cellule à l'autre et de plusieurs paramètres expérimentaux tels que la température, le temps d'incubation, la composition du milieu d'incubation, les concentrations d'antibiotique et de cellules utilisées, la méthode de séparation de la fraction cellulaire du milieu.

1.3.1.3 Modes d'entrée des tétracyclines dans les cellules

Les antibiotiques pénètrent dans les cellules par deux mécanismes principaux: la diffusion et la pinocytose (Maurin & Raoult, 1993; Steinberg, 1994). Le chimiotactisme des phagocytes est diminué par les tétracyclines (Hand et *al.*, 1984, 1985; van den Broeck 1989). Ces antibiotiques entrent dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane cytoplasmique en suivant un gradient de concentration (Brown & Percival 1978; Hand et *al.*, 1985; Maurin & Raoult 1993; Najar et *al.*, 1984; van den Broeck, 1989), et la pénétration est d'autant plus quantitative que le dérivé est liposoluble (Cunha, 1983;

Fourtillan & Lefèbvre, 1980; Fourtillan & Saux, 1977, 1978). L'atteinte de l'équilibre entre les milieux intracellulaire et extracellulaire entraîne l'arrêt de la pénétration de l'antibiotique. Mais selon Brown et Percival (1978), la diffusion passive et la liposolubilité ne suffiraient pas à expliquer à elles seules de grandes différences qui sont observées entre certains antibiotiques.

1.3.1.4 Distribution intracellulaire

La pénétration et l'accumulation des antibiotiques dans les différents compartiments cellulaires sont deux processus distincts. Contrairement aux observations de Du Buy et Showcare (1981), les tétracyclines n'ont pas une localisation mitochondriale exclusive dans les cellules eucaryotes vivantes; Park et Dow (1970) avaient montré qu'elles s'accumulaient aussi dans les noyaux des leucocytes humains. Certains pathogènes intracellulaires obligatoires tels que les *Chlamydia*, se développent au sein de vacuoles intracytoplasmiques appelées inclusions (Ward, 1988). Bien que ces micro-organismes soient sensibles aux tétracyclines au cours de leur cycle de développement, à ce jour il n'existe pas dans la littérature de donnée faisant état de l'importance de l'accumulation de ces antibiotiques dans les inclusions.

1.3.2 Pénétration dans les bactéries

Il existe des différences fondamentales de structure entre les enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Chopra, 1988; Livermore, 1991): les bactéries à Gram positif possèdent une paroi (le peptidoglycane) qui recouvre la membrane cytoplasmique. Une troisième enveloppe constante, la membrane externe, recouvre le peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif (Chopra, 1988; Nikaido, 1970). Seuls les mycoplasmes, les *Chlamydia* et les formes L des bactéries ne possèdent pas de peptidoglycane. Autant chez les bactéries à Gram négatif que chez celles à Gram positif, une enveloppe facultative et la plus en surface, la capsule, peut être présente (Livermore, 1991). Pour accéder à leurs cibles à l'intérieur de la bactérie, les tétracyclines doivent franchir chacune de ces barrières. La pénétration des tétracyclines à travers les parois bactériennes dépend de la structure de l'antibiotique et de la nature de la paroi du micro-organisme (Livermore 1991; Slack & Nichols, 1982).

1.3.2.1 Pénétration à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif

Dans la quasi-totalité des travaux réalisés sur la pénétration des tétracyclines dans les bactéries à Gram négatif, les auteurs ont utilisés des souches de *Escherichia coli* comme micro-organismes tests et la Tétracycline comme antibiotique; il existe beaucoup moins de données sur la doxycycline qui appartient à la catégorie des tétracyclines hydrophobes (lipophiles) comme la minocycline.

Les souches de bactéries à Gram négatif déficientes en pores sont moins sensibles à la Tétracycline (Chopra, 1988; Leive et al., 1984; McMurry et al., 1982; Mortimer & Piddock, 1997; Nikaido et al., 1976): la Tétracycline est un dérivé hydrophile qui diffuse passivement à travers la membrane externe, sous forme de complexes cationiques après chélation de cations métalliques divalents. Le complexe pénètre aussi par les pores constituées par les porines OmpC et non exclusivement par les OmpF (Schnappinger & Hillen, 1996).

Les analogues lipophiles des tétracyclines (minocycline et doxycycline) sont habituellement plus actifs, aussi bien contre les souches sensibles de bactéries à Gram négatif que celles résistantes à la Tétracycline, notamment celles déficientes en porines (McMurry et al., 1982; Schnappinger & Hillen, 1996): ils traversent la membrane externe par diffusion passive à travers ces lipides (Chopra & Hacker, 1992; Chopra, Hawkey & Hinton, 1992; Nikaido et al., 1976).

La Tétracycline, dérivé hydrophile et la doxycycline, son analogue lipophile, traversent la membrane externe par deux mécanismes différents. Cependant, en étudiant l'incidence des variations de température sur les mécanismes de pénétration de la Tétracycline chez *Pseudomonas aeruginosa*, Kitahara et al. (1997) ont constaté que la diffusion à travers les lipides constituait le mécanisme majeur de traversée de la membrane externe par ces antibiotiques.

Les tétracyclines traversent la membrane externe sous leur forme neutre par diffusion à travers les lipides et par les porines sous forme de complexes monocationiques après chélation de cations métalliques divalents comme le Mg^{2+} (Chopra et al., 1992; Schnappinger & Hillen, 1996; Thanassi et al., 1995).

1.3.2.2 Pénétration à travers la paroi des bactéries à Gram positif

Il existe beaucoup moins de données dans la littérature sur les modes de pénétration des tétracyclines dans les bactéries à Gram positif: elle est moins bien comprise que la pénétration à travers la paroi des bactéries à Gram négatif (Kapusnik-Uner et *al.*, 1996). En utilisant la souche de *Staphylococcus aureus* H pour étudier les mécanismes de pénétration dans la bactérie, Hutchings (1969) a émis l'hypothèse de la pénétration de la tétracycline par deux mécanismes distincts possibles sans parvenir à démontrer avec certitude l'existence de système de transport actif: il a mis en évidence l'existence d'un gradient de concentration de la Tétracycline pour attester l'accumulation de l'antibiotique dans la bactérie, mais les systèmes de transport évoqués n'étaient pas saturables. Par ailleurs, aucune distinction n'avait été faite entre le passage à travers les différentes enveloppes de la souche de *S. aureus*. Kuck et Forbes (1973) ont montré que la minocycline, analogue lipophile de la tétracycline, était active sur des souches de *S. aureus* sensibles et résistantes à la tétracycline.

On estime que les tétracyclines diffusent passivement dans le peptidoglycane de ces micro-organismes (Chopra et *al.*, 1991).

1.3.2.3 Pénétration à travers la membrane cytoplasmique

Le passage des tétracyclines à travers la membrane cytoplasmique des bactéries se fait par diffusion passive (Argast & Beck, 1984, 1985; Chopra et *al.*, 1991, 1992). La Tétracycline s'accumule 20 à 30 fois plus dans le cytoplasme de *Staphylococcus aureus* et 100 fois plus dans celui de *E. coli* que dans le milieu extérieur à ces bactéries. Des concentrations de minocycline 100 fois plus supérieures dans le cytoplasme de *E. coli* que dans le milieu extérieur ont également été rapportées (Chopra et *al.*, 1991; McMurry et *al.*, 1982). Ces importants gradients de concentrations des tétracyclines ont fait évoquer dans de nombreux travaux, l'existence de système de transport énergétique de ces antibiotiques dans les bactéries. Mais en utilisant des souches mutantes de *S. aureus* dépourvues de sources endogènes d'énergie, Chopra et *al.* (1991) ont observé l'accumulation de Tétracycline radiomarquée par ces bactéries et ont conclu à l'inexistence de système de transport saturable pour l'accumulation de cet antibiotique dans le cytoplasme. L'existence de tel système n'a pu être mise en évidence chez *E. coli* non plus (McMurry et *al.*, 1982). Cependant, plusieurs chercheurs s'accordent à dire que cette concentration des tétracyclines

serait fortement influencée par la température; elle serait surtout liée à l'important gradient de pH qui existe à travers la membrane cytoplasmique et à la capacité de protonation et de complexation des tétracyclines (Argast & Beck, 1985; Chopra et *al.*, 1992; Nikaido & Thanassi, 1993; Schnappinger & Hillen, 1996).

En résumé, les tétracyclines seraient retrouvées dans le milieu extérieur à la bactérie sous forme intacte neutre et sous forme de complexes monocationiques, en association avec des cations métalliques. La forme neutre franchirait la membrane externe par diffusion passive à travers les lipides, alors que les complexes monocationiques passeraient par les pores. Dans le périplasme, le complexe monocationique serait dissocié en cation métallique et en forme neutre de tétracycline qui franchirait la membrane cytoplasmique grâce à un gradient de pH existant dans cette enveloppe (Schnappinger & Hillen, 1996). Dans le cytoplasme, seule la forme libre est active.

1.4 SPECTRE ANTIBACTÉRIEN

La Tétracycline et la doxycycline sont des antibiotiques aux très larges spectres qui sont actifs contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que contre les *Chlamydia*, *Treponema*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Coxiella*, *Rickettsia* et certaines mycobactéries atypiques comme *Mycobacterium marinum* (Cunha et *al.*, 1982; Grassi, 1995; Goldstein, 1988; Kapusnik-Uner et *al.*, 1996; Klein & Cunha, 1995). Elles sont bactériostatiques *in vitro*, mais à de très fortes concentrations, elles sont bactéricides (Klein & Cunha, 1995). Les dérivés hydrophiles comme la Tétracycline sont généralement moins actifs que leurs analogues lipophiles comme la doxycycline.

En général, les bactéries à Gram positif sont sensibles aux tétracyclines à de plus faibles concentrations que les bactéries à Gram négatif. La doxycycline est plus active contre diverses souches de staphylocoques et de streptocoques que la Tétracycline; mais leur utilisation contre ces micro-organismes est à éviter car elle engendre fréquemment l'émergence de résistance. Les infections dues aux bactéries à Gram négatif constituaient autrefois des indications majeures des tétracyclines; mais de nos jours leur utilisation est très limitée, notamment dans les infections dues aux *Neisseria* et aux *Enterobacteriaceae*. Elles sont inactives contre *Pseudomonas aeruginosa*, mais conservent de bonnes activités contre *P. pseudomallei*, les *Haemophilus*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Xanthomonas*, *Brucella* et *Aeromonas*. La doxycycline est plus active que la Tétracycline

contre les bactéries anaérobies, particulièrement contre les *Actinomyces* (Cunha et al., 1982; Grassi, 1995; Kapusnik-Uner et al., 1996; Klein & Cunha, 1995).

1.5 MÉCANISMES D'ACTION

Les tétracyclines inhiberaient la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur la sous unité 30S du ribosome bactérien et en empêchant l'accès de l'acide ribonucléique (ARN) de transfert (ARNt) porteur d'acides aminés (ARNt-aa) au site accepteur A sur le complexe ARNm-ribosome (Chopra et al., 1992; Kapusnik-Uner et al., 1996; Michel-Briand, 1991; Schnappinger & Hillen, 1996): les tétracyclines inhiberaient ainsi la phase d'élongation de la synthèse des protéines bactériennes. L'inhibition est réversible. Mais le mécanisme moléculaire de l'inhibition de la synthèse des protéines reste controversé (Chopra et al., 1992; Schnappinger & Hillen, 1996).

Au sein des cellules eucaryotes infectées par des bactéries sensibles aux tétracyclines, ces antibiotiques agissent de manière sélective sur les ribosomes bactériens (70S) et les ribosomes mitochondriaux de 70S et non sur les 80S de mammifères; toutefois, l'inhibition de la synthèse des protéines mitochondriales serait mineure et tiendrait à une communauté ancestrale des gènes de leurs ARN ribosomiaux (ARNr) avec ceux des procaryotes (Brown & Ireland, 1978; Chopra et al., 1992). L'action sélective des tétracyclines sur les bactéries s'expliquerait aussi par leur concentration beaucoup plus importante dans les bactéries que dans les cellules eucaryotes (Chopra et al., 1992).

1.6 RÉSISTANCE DES BACTÉRIES AUX TÉTRACYCLINES

La première espèce bactérienne résistante à la tétracycline, *Shigella dysenteriae*, a été isolée en 1953, peu de temps après la découverte des premiers dérivés de cette famille d'antibiotiques (Roberts, 1996). L'utilisation étendue, voire abusive des tétracyclines à travers le monde en médecines humaine et vétérinaire, dans l'alimentation des animaux ou comme additifs alimentaires, a conduit à l'apparition de résistance dans presque tous les genres bactériens (De Rossi et al., 1998; Levy, 1984, 1988, 1992; Kiser et al., 1971; Roberts, 1996; Smith, 1978; Speer et al., 1992). De nombreux genres de bactéries non pathogènes présentes dans la nature sont porteurs de facteurs de résistance qu'ils peuvent transmettre à des bactéries pathogènes habituellement sensibles et les rendre résistantes aux tétracyclines (Hunter & Hill, 1997; Speer et al., 1992). La résistance des bactéries aux

tétracyclines constitue un problème mondial de santé publique (Levy, 1992; Wise et *al.*, 1998).

1.6.1 Mécanismes de résistance aux tétracyclines

Les bactéries résistent aux tétracyclines selon trois mécanismes: (i) la réduction de la concentration de l'antibiotique au sein de la bactérie, notamment grâce aux systèmes d'efflux, (ii) la protection du ribosome et (iii) l'inactivation enzymatique survenant en aérobiose mais dont l'importance clinique est encore inconnue (Chopra et *al.*, 1992; Hunter & Hill, 1997; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et *al.*, 1992).

1.6.1.1 Réduction de la concentration de la tétracycline au sein de la bactérie

La bactérie y parvient aux moyens de deux mécanismes: la réduction de la perméabilité de ses enveloppes et l'efflux des tétracyclines de son cytoplasme (Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et *al.*, 1992).

Réduction de la perméabilité des enveloppes bactériennes

La simplicité de la structure de la paroi des bactéries à Gram positif rend ce mécanisme relativement inopérant chez ces micro-organismes. Les analogues hydrophiles, la tétracycline en l'occurrence, franchissent la paroi des bactéries à Gram négatif par les pores définis notamment par les porines OmpF. Certaines bactéries comme *P. aeruginosa* résistent intrinsèquement à la tétracycline par la restriction de la perméabilité de leurs pores, alors que d'autres comme *E. coli* procèdent par la réduction quantitative de la production des porines ou par la production de porines altérées (Speer et *al.* 1992; Schnappinger & Hillen, 1996). Ces types de mécanismes observés chez *E. coli* peuvent engendrer une diminution de la sensibilité de 6 à 18 fois à une même tétracycline, mais assez souvent elles provoquent la résistance à des antibiotiques d'autres familles comme les β -lactamines et les fluoroquinolones (Speer et *al.*, 1992).

L'efflux des tétracyclines de son cytoplasme

L'efflux des tétracyclines constitue un puissant mode de résistance des bactéries à ces antibiotiques: il consiste à accroître le flux de sortie des antibiotiques du cytoplasme

bactérien. C'est le mécanisme le mieux connu et il serait le plus courant: il existe tant chez les bactéries à Gram positif que chez ceux à Gram négatif, les *Mycoplasma* et *Ureaplasma* (Chopra et al., 1992; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996). Deux types de pompes à efflux interviennent dans cette résistance aux tétracyclines: les pompes de multirésistances et les transporteurs spécifiques de tétracyclines (Chopra et al., 1992; Schnappinger & Hillen, 1996). Les premiers sont utilisés pour expulser du corps bactérien, les tétracyclines ainsi que des antibiotiques qui appartiennent à d'autres familles. Les seconds regroupent les transporteurs qui sont les mieux caractérisés pour les tétracyclines. Ces transporteurs sont énergétiques et leur production est inductible; ils pompent leurs substrats du cytoplasme au périplasma bactérien (Chopra et al., 1992; Hunter & Hill, 1997; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et al., 1992).

L'efflux est dirigé par une force motrice de proton et implique un système anti-port électriquement neutre de proton/tétracycline avec échange d'un complexe monocationique composé de tétracycline ayant chélaté un cation métallique divalent, contre un proton: l'énergie nécessaire à ce transport actif est fournie par le gradient de pH qui existe à travers la membrane cytoplasmique. Plusieurs cations métalliques divalents peuvent être impliqués dans cette complexation et intervenir alors dans le transport, mais à des degrés différents: $\text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (Chopra et al., 1992; Schnappinger & Hillen, 1996).

La majorité des déterminants génétiques des protéines de résistance spécifique des bactéries aux tétracyclines sont d'origines plasmidiques ou sont localisés dans des transposons (Chopra et al., Hawkey & Hinton, 1992; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et al., 1992).

1.6.1.2 Protection ribosomale

Ce mécanisme a été décrit pour la première fois chez le streptocoque (Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et al., 1992); de nos jours, son existence a été confirmée chez d'autres bactéries à Gram positif, chez des bactéries à Gram négatif, les *Mycoplasma* et *Ureaplasma* (Chopra et al., 1992; Hunter & Hill, 1997; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et al., 1992) et il serait plus répandu que la résistance aux tétracyclines liée aux systèmes d'efflux. Il implique une protéine cytoplasmique dont le poids moléculaire est de 72 kDa par analyse de la séquence d'acide désoxyribonucléique

(ADN) du gène codant et de 68 kDa par électrophorèse en gel de polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium. Plusieurs hypothèses existent au sujet du fonctionnement de cette protéine, mais son mode d'action exact n'est pas encore connu (Chopra et *al.*, 1992; Schnappinger & Hillen, 1996; Speer et *al.*, 1992).

1.6.1.3 Inactivation enzymatique des tétracyclines

Ce mécanisme décrit chez *Bacteroides* par Speer et *al.* (1988, 1989, 1991), est le plus récemment connu: elle est due à une protéine cytoplasmique de 44 kDa, dotée d'activité enzymatique et qui modifie chimiquement la tétracycline en présence de NADPH et d'oxygène (Roberts, 1996; Speer et *al.*, 1992). Elle fonctionne comme une oxydo-réductase et uniquement en aérobiose, alors que la majorité des sites infectieux chez l'homme sont pauvrement aérés; par ailleurs son importance clinique est encore mal connue (Chopra et *al.*, 1992; Speer, Shoemaker & Salyers, 1992).

1.6.2 Déterminants génétiques de la résistance aux tétracyclines

1.6.2.1 Nomenclature

Les déterminants de résistance bactérienne aux tétracyclines sont groupés en classes par la méthode d'hybridation croisée ADN-ADN (Chopra et *al.*, 1992; Roberts, 1996; Speer et *al.*, 1992). Cependant, certains déterminants génétiques récemment découverts ont été clonés et séquencés (De Rossi et *al.*, 1998; Magalhães et *al.*, 1998).

Chaque classe de déterminant génétique de résistance à la Tétracycline (*tet*) ou la protéine qu'elle code (Tet) est désignée par une lettre capitale (majuscule) de l'alphabet écrite entre parenthèse ou non. Exemples: *tetA* ou *tet(A)* pour le gène et TetA ou Tet(A) pour le gène et la protéine de résistance à la tétracycline de la classe A. Ce gène et cette protéine peuvent aussi être appelés *tetA(A)* ou TetA(A). Pour la résistance à l'oxytétracycline, le gène est désigné par *otr* et la protéine par Otr (De Rossi et *al.*, 1998; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996). Pour un déterminant de résistance à la Tétracycline de la classe Z composé de deux gènes, le premier est désigné par *tetA(Z)* et le second *tetB(Z)*.

Des gènes répresseurs sont connus pour certains déterminants de résistance impliqués dans l'efflux des tétracyclines chez des bactéries à Gram négatif: ces gènes et leurs protéines sont désignés par *tetR(A)* et TetR(A) respectivement (Chopra et *al.*, 1992; De Rossi et *al.*, 1998; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996).

1.6.2.2 Résistance par efflux de tétracyclines

Les déterminants génétiques impliqués dans ce mécanisme de résistance aux tétracyclines sont les plus nombreux: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetK*, *tetL*, *tetA(P)*, *tetI*, et *otrB* (Chopra et al., 1992; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996). Les déterminants des classes *tetJ* (Magalhães et al., 1998) et *tetV* (De Rossi et al., 1998) sont de description plus récente. Le gène *tetJ* cloné chez *Proteus mirabilis*, une entérobactérie, code pour une protéine de près de 44 kDa qui possède 43,9 % à 78,4 % d'acides aminés en commun avec les autres protéines d'efflux des bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, les protéines TetK, TetL et TetP provoquent la résistance à la Tétracycline, mais pas à la minocycline. Les TetK et TetL entraînent également la résistance à la chlortétracycline (Roberts, 1996). Le déterminant *tetV* a été identifié chez deux espèces de mycobactéries, *Mycobacterium smegmatis* et *M. fortuitum*: il code pour une protéine de 44,6 à 45,7 kDa qui confère à ces bactéries des résistances 2 à 4 fois plus importante à la Tétracycline et 2 fois plus importante à la chlortétracycline; cependant, les souches porteuses de ces déterminants sont sensibles à la doxycycline et à la minocycline (De Rossi et al., 1998).

Chez les bactéries à Gram positif, les protéines codées par les déterminants des classes A, C, D, E, G et H confèrent la résistance à la Tétracycline aux souches porteuses; mais celles-ci sont sensibles à la minocycline. En plus de la résistance à la tétracycline, la TetB confère aussi la résistance à la minocycline (Roberts, 1996).

1.6.2.3 Résistance par protection des ribosomes

Les protéines TetM, TetO, TetB(P), TetQ, TetS et OtrA sont retrouvées tant chez des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et elles leur confèrent la résistance à la Tétracycline, à la doxycycline et à la minocycline. Ces protéines ne sont pas retrouvées chez les entérobactéries, mais elles existent chez d'autres bactéries à Gram négatif (Roberts, 1996). Le déterminant de la classe P retrouvé chez *Clostridium* a une organisation particulière: le gène est composé de deux fragments *tetA(P)* et *tetB(P)* qui se chevauchent et qui codent pour les protéines TetA(P) et TetB(P); contrairement à la TetA(P), la TetB(P) ne serait pas fonctionnelle chez son hôte naturel (Chopra et al., 1992; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996).

1.6.2.4 Inactivation enzymatique

La protéine TetX impliquée dans ce mécanisme de résistance a une composition en acides aminés qui la rapproche des oxydoréductases. Elle ne fonctionne qu'en aérobiose (Chopra *et al.*, 1992; Hunter & Hill, 1997; Roberts, 1996; Schnappinger & Hillen, 1996).

1.7 PHARMACOLOGIE DE LA TÉTRACYCLINE ET LA DOXYCYCLINE

La Tétracycline et la doxycycline se distinguent par leur différence d'affinité pour les lipides: ces caractéristiques de solubilité vont considérablement influencer leur pharmacocinétique.

1.7.1 Absorption

Les tétracyclines sont habituellement administrées par voie orale, mais la doxycycline existe sous forme injectable (Grassi, 1995; Saivin & Houin, 1988; Kapusnik-Uner *et al.*, 1996). Après administration par voie orale, l'absorption des deux antibiotiques a lieu aux niveaux de l'estomac et de la partie supérieure de l'intestin grêle. Elle est influencée par la présence d'aliment dans l'estomac: en général les anciens dérivés, dont la tétracycline, sont mieux absorbés à jeun, alors que les aliments ont peu d'effet sur la doxycycline: dans un estomac vide, la tétracycline est absorbée de 56 % à 80 % et la doxycycline de 90% à 95 %. Leur absorption est diminuée dans l'ordre de 20 % pour la doxycycline et de 50 à 60 % pour la Tétracycline, par la présence de sels de fer, de calcium, de magnésium, d'hydroxyde d'aluminium ou de lait. L'absorption est rapide: la doxycycline est détectable dans le sang 15 à 30 minutes après son administration par voie orale. Lorsqu'ils sont administrés aux doses thérapeutiques habituelles, les pics sériques sont atteints au bout de 2 à 4 h. Leur biodisponibilité est d'autant plus importante que la dose administrée est élevée (Cunha *et al.*, 1982; Goldstein, 1988; Grassi, 1995; Kapusnik-Uner *et al.*, 1996; Klein & Cunha, 1995).

La doxycycline administrée par voie parentérale apparaît plus rapidement dans le sang que celle ingérée par voie orale et la biodisponibilité de l'antibiotique reste plus importante dans la première heure de l'injection (Cunha *et al.*, 1982). Le temps de demi-vie de la tétracycline varie entre 6 et 12 heures, alors que celui de la doxycycline varie entre 14 et 22 heures (Goldstein, 1988; Kapusnik-Uner *et al.*, 1996; Klein & Cunha, 1995) et le taux thérapeutique peut être maintenu pendant plus de 34 heures (Cunha *et al.*, 1982).

La doxycycline administrée par voie orale à des souris de 25 à 26 g, à raison de 50 mg/kg de poids de souris, est absorbée à près de 92%. Cette absorption ne semble pas influencée par la présence d'aliment dans l'estomac des souris. Indépendamment de la voie d'administration, qu'elle soit orale ou intraveineuse, le temps de demi-vie est de 170 minutes. L'antibiotique reste à un taux élevé dans le sang pendant plus de 4 h (Böcker & Estler, 1981).

1.7.2 Distribution

L'importance de la liaison des tétracyclines aux protéines varie selon les dérivés: indépendamment des méthodes d'étude utilisées, 20 à 65 % de Tétracycline et 70 à 93 % de doxycycline se trouvent liés aux protéines du sérum humain (Brown & Ireland, 1978; Cunha *et al.*, 1982; Fourtillan & Lefèbre, 1980; Goldstein, 1988; Grassi, 1995; Green, *et al.*, 1976; Klein & Cunha, 1995; Saivin & Houin, 1988). Les taux de liaison des deux dérivés aux protéines de sérums d'animaux sont comparables à ceux observés chez l'homme (Barza *et al.*, 1975; Böcker *et al.*, 1984).

La Tétracycline et la doxycycline ont de bonnes répartitions tissulaires chez l'homme et chez les animaux: toutes deux sont retrouvées dans divers organes et leurs concentrations sont plus de 2 fois supérieures dans certains organes que dans le sérum (Böcker *et al.*, 1984; Cunha *et al.*, 1982; Klein & Cunha, 1995). Cependant, la plus grande lipophilie de la doxycycline lui confère une capacité de pénétration tissulaire beaucoup plus importante que celle de la Tétracycline: la doxycycline est 5 fois plus lipophile que la Tétracycline (Barza *et al.*, 1975; Saivin & Hill, 1988; Fourtillan & Lefèbre, 1980; Goldstein, 1988; Kleine & Cunha, 1995).

1.7.3 Métabolisme et excrétion

La Tétracycline serait éliminée sans avoir subi de modification chimique, contrairement à la doxycycline dont la transformation a été mise en évidence expérimentalement dans le foie et les reins de souris, par HPLC (Böcker *et al.*, 1982; Brown & Ireland, 1978; Cunha *et al.*, 1982). L'administration simultanée de produits comme la rifampicine, qui induisent la production d'enzymes hépatiques, a aussi permis de détecter des métabolites: la doxycycline est sujette à une biotransformation (Saivin & Houin, 1988).

Seules les formes libres des tétracyclines, c'est-à-dire celles non liées aux protéines, sont éliminées par l'organisme. Les dérivés polaires sont surtout éliminés par voie rénale: plus de 50 % de la dose de Tétracycline administrée par voie orale et 70 % de la dose administrée par voie parentérale sont excrétées dans les urines (Barza et al., 1975; Brown & Ireland, 1978; Fourtillan & Lefèbvre, 1980; Kleine & Cunha, 1995). Par contre, les analogues lipophiles ont une élimination urinaire réduites et sont surtout excrétés dans les selles: 19 % à 35 % de la dose de doxycycline administrée par voie orale ou parentérale, sont éliminées par voie urinaire contre tout le reste par voie digestive sous formes de conjugués inactifs ou de chélates issus du métabolisme entéro-hépatique (Cunha et al., 1982; Goldstein, 1988; Saivin & Houin, 1988). En général, les problèmes de défaillance rénale ou d'insuffisance hépatique n'ont pas d'incidence majeure sur l'administration de la doxycycline aux patients. Cependant, une alcalinisation des urines engendre une augmentation de l'élimination urinaire de la doxycycline alors qu'elle est sans effet notable sur celle de la tétracycline (Brown & Ireland, 1978; Cunha et al., 1982).

1.8 UTILISATIONS THÉRAPEUTIQUES

La découverte de nouveaux antibiotiques et l'accroissement de la résistance bactérienne ont considérablement réduit le champ d'utilisation des tétracyclines disponibles actuellement en clinique; toutefois, elles restent des antibiotiques de choix dans le traitement des infections dues aux *Brucella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, rickettsies, *Pseudomonas pseudomallei* et à certaines mycobactéries atypiques.

1.8.1 Dans les infections urogénitales

Les urétrites non gonococciques dues à *C. trachomatis*, *Calymatobacterium granulomatis* et *Ureaplasma urealyticum* sont des indications majeures de l'utilisation des tétracyclines (CDC, 1993; Cunha et al., 1982; Goldstein, 1988; Grassi, 1995; Klein & Cunha, 1995). Elles sont efficaces contre les souches de gonocoques non productrices de pénicillinases et constituent des alternatives dans les cas de syphilis (*Treponema pallidum*) avec allergie à la pénicilline et dans les infections à *Haemophilus ducreyi*. Dans les cas d'infections concomitantes à *Chlamydia* et à *N. gonorrhoeae*, la Tétracycline ou la doxycycline est associée à une β -lactamine efficace ou à un macrolide (CDC, 1993; Klein & Cunha, 1995; Ridgway, 1997).

1.8.2 Dans les infections respiratoires

Les tétracyclines, en l'occurrence la tétracycline et la doxycycline, sont très efficaces contre les agents d'infections respiratoires comme *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Francisella tularensis* et *Coxiella burnetti*. La doxycycline donne également de très bon résultats dans les infections des voies respiratoires supérieures, dont les sinusites. Cependant, elles sont utilisées en seconde intention dans les infections respiratoires à *Haemophilus influenzae* et à *Streptococcus pneumoniae* de par leur résistance croissante à ces antibiotiques: les cliniciens leur préfèrent des céphalosporines de deuxième ou de troisième génération (Chopra et al., 1992; Cunha et al., 1982; Grassi, 1995; Klein & Cunha, 1995).

1.8.3 Dans les infections gastrointestinales

La doxycycline est parfois utilisée dans la prévention de gastroentérites dues à *E. coli* (diarrhées du voyageur) et à *Vibrio cholerae*; mais la résistance croissante des souches de *V. cholerae* de *Shigella* et de *Salmonella* aux tétracyclines réduit leur intérêt dans le traitement des infections dues à ces micro-organismes (Chopra et al., 1992; Cunha et al., 1982; Grassi, 1995; Klein & Cunha, 1995).

1.8.4 Autres indications

Les tétracyclines trouvent aussi des indications dans les infections cutanées à germes sensibles. La Tétracycline et la doxycycline possèdent de nombreuses autres propriétés médicamenteuses qui pourraient trouver des indications cliniques efficaces dans l'avenir (Chopra et al., 1992; Grassi, 1995; Klein & Cunha, 1995; Golub et al., 1996).

1.9 EFFETS INDÉSIRABLES ET TOXICITÉ

Les tétracyclines sont considérées comme des médicaments peu toxiques; toutefois la tétracycline et la doxycycline peuvent provoquer plusieurs effets indésirables chez les patients auxquels elles sont administrées.

1.9.1 Troubles digestifs

Ils dépendent des doses administrées. La tétracycline et la doxycycline peuvent provoquer des ulcérations et des constrictions œsophagiennes, des épigastralgies, des

nausées et des vomissements (Bryant et *al.*, Fisher & Kluge, 1987; Grassi, 1995). Les diarrhées observées avec la Tétracycline sont des conséquences de la perturbation de la flore intestinale qui peuvent donner lieu à des entérites staphylococciques, une candidose digestive ou une colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile*. La Tétracycline peut aussi provoquer une pancréatite aiguë. L'administration intraveineuse de fortes doses de tétracyclines à la femme enceinte peut être à l'origine de troubles hépatiques toxiques, surtout en cas d'insuffisance rénale associée ou d'insuffisance hépatique préalable (Cunha et *al.*, 1982; Goldstein, 1988; Kleine & Cunha, 1995; Manten, 1968, 1972).

1.9.2 Réactions d'hypersensibilité cutanée

La Tétracycline et la doxycycline peuvent provoquer des troubles de photosensibilisation, des réactions allergiques à type de rash, de prurit, de dermatite exfoliante, ou d'urticaire. Les réactions phototoxiques sont surtout liées à l'administration de doxycycline (Goldstein, 1988; Grassi, 1995; Kleine & Cunha, 1995; Manten, 1968, 1972).

1.9.3 Anomalies osseuses et dentaires

La Tétracycline et la doxycycline peuvent se fixer sur les dents et les os dès les premières périodes de calcification: il en résulte des pigmentations dentaires gris-jaunâtres, des malformations osseuses et dentaires et des hypoplasies de l'émail dentaire. Les tétracyclines franchissent la barrière placentaire, si bien que certaines anomalies osseuses peuvent survenir *in utero* chez un fœtus dont la mère est traitée avec des tétracyclines après le troisième mois de grossesse. Ces anomalies osseuses et dentaires contre-indiquent l'utilisation des tétracyclines chez l'enfant de moins de 8 ans, chez la femme enceinte après 3 mois de grossesse et au cours de l'allaitement; elles sont dose-dépendantes et moins marquées avec la doxycycline (Goldstein, 1988; Grassi, 1995; Kleine & Cunha, 1995; Manten, 1968, 1972).

1.9.4 Troubles rénaux

La néphrotoxicité des tétracyclines est généralement peu marquée; elle survient surtout sur un terrain d'insuffisance rénale préexistante. La Tétracycline exacerbe cette insuffisance rénale alors que la doxycycline peut être administrée aux doses régulières chez

ces patients. L'administration de tétracyclines périmées serait aussi à l'origine de néphrotoxicité (Goldstein, 1988; Grassi, 1995; Kleine & Cunha, 1995; Manten, 1972).

1.9.5 Troubles au niveau du système nerveux

La toxicité de la tétracycline et la doxycycline au niveau du système nerveux peut se manifester, tant chez l'enfant que chez l'adulte, sous forme d'hypertension intracrânienne; mais le mécanisme de cette manifestation est inconnu (Cunha *et al.*, 1982; Goldstein, 1988; Kleine & Cunha, 1995).

1.9.6 Autres effets indésirables et toxiques

La tétracycline peut provoquer des troubles hématologiques de types anémie hémolytique et thrombopénie. Des inhibitions de fonctions de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes ont été décrites *in vitro* et *in vivo* chez des modèles murins. L'administration de tétracyclines peut être à l'origine d'altérations de la flore vaginale normale qui se traduisent par des candidoses génitales. Les injections intraveineuses de tétracyclines peuvent engendrer des phlébites (Goldstein, 1988).

1.10 INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES

L'absorption de la Tétracycline est considérablement réduite lorsqu'elle est administrée simultanément avec des cations métalliques comme le calcium contenu dans les sels de calcium et le lait et ses produits dérivés, le magnésium, l'aluminium ou le bicarbonate de soude contenus dans des médicaments comme les antiacides et le sulfate ferreux. La doxycycline est moins affectée par ce phénomène (Manten, 1968, 1972).

Le temps de demi-vie de la doxycycline est écourtée à 50 % par des inducteurs d'enzymes microsomiales hépatiques comme les antiépileptiques (carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne) qui accentuent son métabolisme: un ajustement de doses à administrer s'impose alors. La consommation chronique d'alcool réduit également la demi-vie de la doxycycline.

Les tétracyclines peuvent amplifier l'effet des anticoagulants (antivitaminiques K) et réduire l'efficacité des contraceptifs oraux par diminution des taux d'oestrogènes conjugués. Les tétracyclines sont des antagonistes de la pénicilline (Goldstein, 1988; Grassi, 1995).

1.11 CONCLUSION

Les indications des tétracyclines en infectiologie ont été réduites par l'extension de la résistance bactérienne. En clinique, ces antibiotiques constituent les premiers recours pour le traitement de MST chlamydiennes; mais récemment, l'existence d'isolats cliniques de souches oculogénitales de *C. trachomatis* résistantes *in vitro* à la tétracycline et à la doxycycline a été rapportée. Toutefois, les mécanismes et les supports moléculaires de cette résistance de même que son importance clinique restent inconnue (Jones et *al.*, 1990; Lefèvre et *al.*, 1997). Il apparaît nécessaire d'appréhender ce phénomène relativement naissant et de faire face aux diverses adaptations des micro-organismes à ces antimicrobiens. La lutte contre la résistance requiert une application rigoureuse des mesures de prescription et d'utilisation de ces antibiotiques. La mise au point de nouvelles molécules ou de nouvelles formulations constituent aussi des alternatives: la découverte récente des glycylyclines en est une illustration (Tally et *al.*, 1995; Testa et *al.*, 1993; Sum et *al.*, 1994). Cependant, ces nouvelles tétracyclines ne sont pas encore disponibles en clinique. Par ailleurs, il a été démontré que les formulations liposomales de la Tétracycline étaient nettement plus actives sur *C. trachomatis in vitro* que l'antibiotique libre (Al-Awadhi et *al.*, 1992). Ces deux aspects constituent autant d'avenues pour l'utilisation efficiente des cyclines en médecine.

2. LES LIPOSOMES

2.1 INTRODUCTION

Les liposomes ont été décrits pour la première fois, par Bangham et *al.*, (1965) en Angleterre, alors qu'ils étudiaient la perméabilité de membranes biologiques constituées de phospholipidiques, aux ions. En recouvrant d'eau un film lipidique contenu dans un flacon, Bangham avait constaté qu'il se produisait un réarrangement moléculaire des lipides de sorte à former des vésicules lipidiques bilamellaires renfermant de l'eau (Bangham et *al.*, 1965). Par la suite, les liposomes servirent d'outils de recherche sur les membranes biologiques desquelles ils sont structurellement très proches. Mais au cours des trente années qui ont suivi cette découverte, le concept des liposomes a considérablement évolué: de nos jours, ils sont plutôt utilisés comme des vecteurs colloïdaux de médicaments de

natures diverses parmi lesquels les antimicrobiens occupent une place importante (Betageri et *al.*, 1993; Bakker-Woudenberg & Lokerse, 1991; Chonn & Cullis, 1998; Karlowky & Zhanel, 1992; Lopez-Berestein, 1987; Omri & Ravaoarino, 1998; Ostro, 1987; Ravaoarino & Toma, 1993). Ils transportent ces drogues dans les milieux biologiques et contribuent à l'amélioration de leur efficacité au niveau de leurs sites d'action.

2.1.1 Définition

Les liposomes sont des vésicules lipidiques microscopiques dont la paroi est constituée par un ou plusieurs feuillets bilamellaires phospholipidiques et qui contiennent une phase aqueuse en leur sein (Bangham et *al.*, 1965; Betageri et *al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Marchal-Heussler et *al.*, 1990).

2.1.2 Nomenclature des liposomes

Depuis les premières préparations liposomales de Bangham et *al.*, (1965), plusieurs types de liposomes ont été caractérisés. Certains auteurs les avaient classés selon les noms des chercheurs qui avaient été les premiers à les préparer et/ou à les caractériser: par exemples, on distinguait des "Banghamosomes" et des "Huangosomes" en référence à Bangham et Huang (1969) qui avaient les premiers à préparer et à caractériser des "liposomes" ou encore des "vésicules lipidiques" (Lichtenberg & Barenholz, 1988). La nomenclature peut reposer sur la méthode de préparation des liposomes (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Perkins et *al.*, 1993); mais de nos jours, la taille et le nombre de bicouches lipidiques qui composent les liposomes sont les principaux critères retenus pour leur nomenclature (Betageri et *al.*, 1993; Karlowky & Zhanel, 1992; Kulkarni et *al.*, 1995; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Omri & Ravaoarino, 1998; Ostro, 1987). Les liposomes constitués de plusieurs bicouches lipidiques sont appelés multi ou oligolamellaires. Les trois principaux types de liposomes sont les liposomes multilamellaires (MLV), les petits liposomes unilamellaires (SUV) et les grands liposomes unilamellaires (LUV).

2.1.2.1 Les liposomes multilamellaires (MLV)

Ils sont composés de plusieurs bicouches lipidiques concentriques qui matérialisent plusieurs compartiments aqueux. Leurs diamètres varient de 200 nm à 5000 nm. Leurs capacités d'encapsulation des molécules actives sont comprises entre 5 % et 15% (Kulkarni

et *al.*, 1995; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Marchal-Heussler et *al.*, 1990; Perkins et *al.*, 1993), et selon les méthodes de préparation, ils pourraient atteindre des valeurs très élevées de 89 % (Fattal et *al.*, 1993).

2.1.2.2 Les liposomes petits liposomes unilamellaires (SUV)

Les SUV sont délimités par une seule bicouche lipidique qui matérialise un seul compartiment aqueux dont la capacité d'encapsulation est faible et varie de 0,5% à 1%: leurs diamètres sont compris entre 20 nm et 100 nm (Kulkarni et *al.*, 1995; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Marchal-Heussler et *al.*, 1990; Perkins et *al.*, 1993)

2.1.2.3 Les grands liposomes unilamellaires (LUV)

Ces liposomes sont constitués d'une seule bicouche lipidique, mais ils sont de plus grandes tailles que les SUV avec des diamètres qui varient de 100 nm à 1000 nm (Johnson et *al.*, 1971; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Marchal-Heussler et *al.*, 1990; Perkins et *al.*, 1993). Leur capacité d'encapsulation varie de 35% à 65% (Kulkarni et *al.*, 1995; Szoka & Papahadjopoulos, 1978).

2.1.2.4 Autres types de liposomes

Les limites de tailles utilisées dans la classification des liposomes est arbitraire il existe d'autres types de liposomes parmi lesquels figurent les liposomes unilamellaires de taille moyenne (MUV) dont les diamètres varient de 50 nm à 100 nm, les liposomes géants unilamellaires (GUV) dont les diamètres sont supérieures à 1 µm, et les liposomes multivésiculaires (MVV) dont les diamètres varient de 100 nm à 20 µm. Des liposomes oligolamellaires (OLV) ont également été décrits (Kulkarni et *al.*, 1995; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Perkins et *al.*, 1993).

Les tailles des liposomes varient considérablement selon les méthodes de préparation (Dousset & Douste-Blazy, 1985; Fattal et *al.*, 1993): la classification basée sur les modes de préparation permet également de distinguer plusieurs types de liposomes dont les plus connus sont les liposomes "reverse" (Reverse Evaporation Vesicles: REV). Ces derniers peuvent être uni, multi ou oligolamellaires: ils sont préparés selon un mode dit "en phase reverse". Leurs capacités d'encapsulation sont voisines de celles des LUV (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Marchal-Heussler et *al.*, 1990; Perkins et *al.*, 1993).

2.2 PRÉPARATION DES LIPOSOMES

La taille des liposomes et la stabilité de leurs membranes sont deux caractéristiques fondamentales de la production des liposomes. La stabilité des membranes dépend de la nature des lipides entrant dans la composition des vésicules et la taille dépend de la méthode de préparation (Dousset & Douste-Blazy, 1985; Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Puisieux & Poly, 1985).

2.2.1 Lipides utilisés dans la préparation des liposomes

Les composantes utilisées pour la préparation des liposomes peuvent être d'origine naturelle ou synthétique: ce sont principalement des phospholipides. Un phospholipide est une molécule amphiphile dont l'extrémité hydrophobe est constituée de deux chaînes d'acides gras contenant chacune, 10 à 20 atomes de carbone et 6 doubles liaisons au plus; l'extrémité hydrophile, polaire, est constituée d'acide phosphorique lié à une molécule hydrosoluble. Ces lipides sont des composantes majeures des liposomes: ils s'organisent en bicouche lipidique en présence d'eau, seuls ou sous forme de mélange. Ils peuvent posséder une charge négative [cardiolipine (CL), phosphatidylserine (PS), phosphatidyl éthanolamine (PE), acide phosphatidique (PA), dicétylphosphate, DPPS, phosphatidyl inositol (PI), phosphatidylglycérol (PG)], positive (stéarylamine, SA) ou neutre [phosphatidyl cholines (PC) ou lécithines et la sphingomyéline bovine (SM)]. La lécithine naturelle provient de jaune d'oeuf ou de soja. Il existe plusieurs autres lipides synthétiques chargés négativement qui dérivent du PG et de l'acide phosphatidique ainsi que des PC et PE (Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

Malgré l'existence de cette variété de phospholipides, le choix des chercheurs se limite habituellement aux lécithines naturelles ou synthétiques. L'incorporation de phosphatidyl glycérol (PG) confère une charge négative à la surface des vésicules alors que la stéarylamine (SA) les rend positives (Dousset & Douste-Blazy, 1985; Fattal *et al.*, 1993; Kulkarni *et al.*, 1995; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Perkins *et al.*, 1993). La présence du cholestérol dans les liposomes réduit leur perméabilité et accroît considérablement leur stabilité physique (Kulkarni *et al.*, 1995; New, 1995; Oldfield & Chapman, 1971; Puisieux & Poly, 1985). Outre le cholestérol, d'autres composantes non phospholipidiques peuvent être intégrées dans les structures liposomales pour moduler leurs fonctions ou leur pharmacocinétique (Philippot *et al.*, 1995).

2.2.2 Méthodes de préparation des liposomes

Il est essentiel de contrôler la qualité des lipides constitutifs avant la préparation des liposomes: ceci est d'autant plus important que les phospholipides de sources naturelles sont souvent des mélanges de produits. Plus de 20 méthodes de préparations sont décrites dans la littérature (Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988). En général, elles consistent à dissoudre les composantes lipidiques dans un seul ou un mélange de solvants organiques volatiles comme le chloroforme et/ou l'éthanol. L'élimination du solvant organique dans des conditions de température et/ou de pression précises aboutit à la formation de lipides "secs", sous forme de film, de poudre ou de culot granulaire, dont la réhydratation avec un milieu aqueux contenant les solutés, conduit à la formation d'une suspension de liposomes qui renferment les solutés. Les tailles des vésicules produites peuvent être réduites par des techniques d'extrusion ou de fragmentation mécanique. La fraction liposomale peut être séparée du reste du milieu aqueux contenant la part de soluté non encapsulée, par diverses méthodes dont la centrifugation, la dialyse ou la filtration (Betageri *et al.*, 1993; Dousset & Douste-Blazy, 1985; Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

2.2.2.1 Préparation des liposomes multilamellaires (MLV)

La référence reste la méthode d'hydratation d'un film phospholipidique décrite par Bangham *et al.* (1965). Elle consistait à dissoudre la lécithine d'oeuf, avec ou sans phospholipide chargé, dans du chloroforme dans un ballon à fond rond de 50 mL. L'évaporation du solvant organique sous vide conduisait à la formation d'un film lipidique au fond du ballon qui était ensuite hydraté par addition du milieu aqueux contenant le(s) soluté(s). L'agitation du mélange conduisait à un réarrangement des phospholipides en vésicules renfermant le(s) soluté(s) dans le milieu aqueux.

La présence de lipides de charge positive ou négative accroît la capacité d'encapsulation des MLV en augmentant les espaces entre les différentes bicouches (Betageri *et al.*, 1993; Kulkarni *et al.*, 1995; Lichtenberg & Barenholz, 1988). Cependant, les drogues hydrosolubles sont faiblement encapsulées dans les liposomes préparés par des techniques de réhydratation de lipides secs. Papahadjopoulos et Watkins (1967) ont développé une technique de réhydratation en présence de solvant organique qui permet de préparer des MLV dont les taux d'encapsulation de phase aqueuse peuvent être supérieurs à 40 %. Les

MLV peuvent être préparés par des techniques de congélation/décongélation et de lyophilisation/réhydratation (Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

2.2.2.2 Préparation des petits liposomes unilamellaires (SUV)

L'utilisation d'ultrasons pour rompre les grandes vésicules est l'une des plus anciennes techniques de préparation de SUV (Huang, 1969). Ces types de liposomes peuvent également être préparés par des techniques d'extrusion successives à travers des filtres de polycarbonates ou d'extrusion à la presse de French (Barenholz *et al.*, 1979), des techniques d'injection d'éther (Deamer & Bangham, 1976), d'éthanol ou d'autres solvants miscibles à l'eau comme le glycérol ou l'éthanol (Betageri *et al.*, 1993; Dousset & Douste-Blazy, 1985; Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

2.2.2.3 Préparation des grands liposomes unilamellaires (LUV)

Les LUV sont préparés par des techniques de solubilisation des lipides en présence de détergent suivie de l'élimination du détergent par dialyse, par vaporisation ou par chromatographie (Betageri *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988). Ils peuvent aussi être préparés par des cycles de congélation/décongélation (Bally *et al.*, 1988) ou par évaporation en phase reverse, la méthode de préparation des REV (Szoka & Papahadjopoulos, 1978) qui permet d'obtenir un taux d'encapsulation de l'ordre de 65%.

Le nombre des méthodes citées n'est pas exhaustif. Un même type de liposome peut être préparé par plusieurs méthodes (Deamer & Bangham, 1976; Olson *et al.*, 1979). De même, des combinaisons de techniques peuvent être utilisées pour préparer les liposomes (Betageri *et al.*, 1993; Dousset & Douste-Blazy, 1985; Fattal *et al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Szoka *et al.*, 1980). Par ailleurs, la plupart des méthodes de préparation utilisées ne permettent pas de produire un seul type de liposome: en général, la préparation est constituée d'une population hétérogène de vésicules qui diffèrent par leurs tailles et par le nombre de lamelles.

Le choix de la méthode à retenir doit tenir compte de la nature du produit à encapsuler: celui-ci ne doit être dénaturé, ni perdre son activité dans le cas des drogues et des antimicrobiens en particulier.

2.2.3 Caractérisation des liposomes

Les liposomes préparés peuvent être caractérisés par plusieurs paramètres dont les plus fréquemment utilisés sont: la lamellarité, les tailles des liposomes, le volume encapsulé et la distribution des produits encapsulés dans les liposomes (Betageri et *al.*, 1993; Cullis et *al.*, 1987; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Vidal, 1993).

2.2.3.1 La lamellarité

Elle définit le nombre moyen de lamelles par vésicule au sein d'une population hétérogène de liposomes. Les méthodes d'étude sont nombreuses, mais les plus courantes sont la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) utilisant du phosphore radioactif (^{31}P) et la microscopie électronique des liposomes rompus par congélation (Betageri et *al.*, 1993; Cullis et *al.*, 1987; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

2.2.3.2 La taille

Les liposomes présents dans les préparations sont hétérogènes en tailles et en général, aucune technique ne permet de déterminer toutes les tailles présentes et cela est d'autant plus difficile qu'il s'agit de MLV. L'estimation de la distribution des tailles peut être faite par l'utilisation de compteur Coulter pour des vésicules de diamètre supérieur à $1\mu\text{m}$, par des techniques de microscopie, de chromatographie, d'ultracentrifugation analytique, de turbidimétrie, de RMN ou de diffusion de la lumière, notamment le laser, à travers la suspension liposomale (Betageri et *al.*, 1993; Cullis et *al.*, 1987). Mais chaque technique a ses limites (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Fattal et *al.*, 1993).

2.2.3.3 Le volume encapsulé

La capacité d'encapsulation d'une vésicule dépend de sa taille et du nombre de lamelles, mais elle doit également tenir compte de la lipo- ou de l'hydrosolubilité du produit à encapsuler. Au sein d'un liposome, les produits hydrosolubles sont présents dans la phase aqueuse alors que les produits liposolubles sont localisés dans les bicouches lipidiques. Cette caractéristique des liposomes donne lieu à plusieurs types de définitions qui prêtent à confusion et parmi lesquelles figurent l'efficacité d'encapsulation, la capacité d'encapsulation, le volume d'encapsulation ou volume de capture (Kulkarni et *al.*, 1995; Omri et *al.*, 1995; Ravaoarino et *al.*, 1993). Classiquement, le volume d'encapsulation

d'une préparation liposomale est exprimé par le volume capturé par unité de mesure quantitative de lipides utilisés (Betageri et *al.*, 1993; Cullis et *al.*, 1987; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Vidal, 1993) ou encore le taux maximal de produit pouvant être encapsulé pour une concentration de lipide particulier (Kulkarni et *al.*, 1995): il peut varier de 0,5 $\mu\text{L}/\mu\text{mole}$ pour certaines MLV et SUV à 30 $\mu\text{L}/\mu\text{mole}$ de phospholipide pour certaines LUV. La capacité d'encapsulation peut être déterminée en incorporant les vésicules, des solutés radioactifs non-diffusibles à travers les parois liposomales (le sodium radioactif, ^{22}Na ou l'inuline marquée au ^{14}C) et en dosant la radioactivité résiduelle par lipide de la fraction non-encapsulée (Betageri et *al.*, 1993; Cullis et *al.*, 1987; Lichtenberg & Barenholz, 1988). Pour d'autres chercheurs, l'efficacité d'encapsulation est définie par le pourcentage de produit encapsulé dans les liposomes en rapport avec la quantité initiale du produit utilisé: après lyse des vésicules par un détergent tel du 0,2% Triton-X 100, le taux de produit encapsulé est déterminé par des méthodes appropriées. La détermination de l'efficacité d'encapsulation peut aussi se faire déduction, en déterminant le produit contenu dans le milieu aqueux duquel la fraction liposomale a été séparée lors de la préparation (Omri et *al.*, 1995; Ravaoarino et *al.*, 1993).

2.2.3.4 La distribution du produit encapsulé dans les liposomes

Cette distribution dans les préparations liposomales obtenues par dispersion mécanique dans un milieu aqueux n'est pas équilibrée: la concentration du produit incorporé dans les vésicules phospholipidiques est substantiellement inférieure à celle du milieu aqueux externe. Ce déséquilibre s'expliquerait par la diffusion plus rapide de l'eau que les solutés, à travers les bicouches lipidiques. Cependant, l'utilisation de techniques de préparation en présence de détergent, ou de cycles de congélation/décongélation permet de pallier à de tels inconvénients. La RMN est la technique de choix pour l'étude de cette caractéristique des liposomes (Betageri et *al.*, 1993; Cullis et *al.*, 1987; Fattal et *al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

2.3 STABILITÉ DES LIPOSOMES

Pour des formulations liposomales destinées à des usages pharmaceutiques, l'idéal serait qu'elles puissent rester stables et être conservées en bon état, pendant 1 à 2 ans ou plus, à la température ambiante ou à 4°C. Cependant, les lipides constitutifs peuvent être

dégradés selon des processus chimiques et/ou physiques qui affecteraient le produit encapsulé, en l'occurrence l'activité de l'antimicrobien (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Betageri *et al.*, 1993; Grit & Crommelin, 1993; Pejaver, 1993). Quand bien-même l'objectif de la durée de conservation des préparations liposomales serait atteint, si elles doivent être reconstituées après la décongélation ou la remise en suspension dans un milieu aqueux au moment de l'emploi, des problèmes de stabilité chimique et/ou physique pourraient survenir (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Betageri *et al.*, 1993). Une alternative de préparation des liposomes destinées à une utilisation extemporanée au lit du malade a été proposée par Liautard et Philippot (1993) pour pallier aux problèmes de stabilité et à certains obstacles pharmacologiques; mais cette démarche aussi n'est pas sans inconvénients.

2.3.1 Problèmes de stabilité chimique

La dégradation chimique des lipides constitutifs des liposomes consiste habituellement en l'oxydation du cholestérol et surtout des acides gras insaturés des phospholipides, particulièrement ceux des PE, PS et PC naturelles, et sur l'hydrolyse des ponts esters qui lient les acides gras aux résidus de glycérol. L'oxydation des lipides au cours du processus de dégradation, peut être catalysée par les ions métalliques, la lumière, l'oxygène, les températures élevées et les irradiations.

La dégradation chimique des lipides peut être mise en évidence par plusieurs méthodes dont la spectrophotométrie, la chromatographie en couche mince, la chromatographie en phase gazeuse et la méthode HPLC (Betageri *et al.*, 1993; Grit & Crommelin, 1993; Klein, 1970; Lang & Vigo-Pelfrey, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

L'utilisation de phospholipides semi-synthétiques saturés moins sensibles à l'oxydation ou de chélateurs, la conservation des préparations à 4°C, à des pH appropriés, à l'abri de la lumière et des irradiations constituent des moyens qui permettent de minimiser la dégradation chimique des liposomes (Betageri *et al.*, 1993; Grit & Crommelin, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

2.3.2 Problèmes de stabilité physique

Ils peuvent se manifester par l'agrégation ou la fusion des vésicules ou par la libération du contenu liposomal après rupture des vésicules (Betageri *et al.*, 1993;

Lichtenberg & Barenholz, 1988). À l'absence de charge dans les liposomes ou en présence de polycations dans les préparations liposomales de charge négative, les vésicules ont tendance à fusionner ou à s'agglutiner spontanément: ainsi des SUV peuvent devenir des LUV ou des MLV: ces modifications peuvent être mises en évidence par les méthodes usuelles de détermination de la taille des liposomes (Betageri et *al.*, 1993; Grit & Crommelin, 1993; Lang & Vigo-Pelfrey, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Puisieux & Poly, 1985). Elles peuvent être évitées par la présence de lipides chargés dans la composition des liposomes ou par l'addition de 25 à 30 % de cholestérol qui diminue la perméabilité des bicouches lipidiques tout en augmentant la stabilité des vésicules; au-delà d'une teneur de 50% de cholestérol, les vésicules deviennent instables (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Puisieux & Poly, 1985).

Le contenu liposomal libéré peut être caractérisé et dosé après séparation de la fraction liposomale du milieu aqueux de suspension. L'utilisation de MLV plus stables que les SUV, la conservation des préparations à de basses températures ou à l'état de gel, la sélection de phospholipides comportant de longues chaînes acyls sont autant des solutions à la perméabilisation ou la rupture des membranes liposomales (Betageri et *al.*, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Puisieux & Poly, 1985).

2.4 PHARMACOCINÉTIQUE DES LIPOSOMES

2.4.1 Interactions liposomes - cellules

Les liposomes peuvent interagir avec les cellules selon 4 mécanismes fondamentaux non exclusifs, pour assurer le passage de la drogue encapsulée en milieu intracellulaire: (i) l'adsorption, (ii) la phagocytose/endocytose, (iii) l'échange de lipide et (iv) la fusion (Betageri et *al.*, 1993; Bienvenue & Philippot, 1985; Karlowsky & Zhanel, 1992; Margolis, 1988; Ostro, 1987).

Après adsorption des liposomes à la surface cellulaire, le produit encapsulé est progressivement libéré dans le milieu extracellulaire et une partie plus ou moins importante du-dit produit pénètre dans le cytoplasme de la cellule. Les vésicules adsorbées à la surface des cellules peuvent être endocytées par les cellules phagocytaires (Wassef & Alving, 1993) et la vacuole endosomale dont le pH varie de 5 à 5,5 et qui contient le liposome, fusionne avec les lysosomes pour amorcer le processus de digestion: les phospholipides sont alors hydrolysés en acides gras et si le contenu liposomal est sensible aux conditions

de dégradation des lysosomes, il est détruit lui aussi, sinon il est libéré dans le cytoplasme (Betageri *et al.*, 1993; Bienvenue & Philippot, 1985). Cependant, les liposomes phagocytés peuvent aboutir à des compartiments intracellulaires (Golgi) autres que les lysosomes, dépendamment de leur taille (Betageri *et al.*, 1993). Le processus de phagocytose ou d'endocytose survient après l'opsonisation des vésicules par des protéines plasmatiques (IgG, complément) ou leur association avec les lipoprotéines plasmatiques de faible densité (Betageri *et al.*, 1993; Bienvenue & Philippot, 1985; Wassef & Alving, 1993).

Les membranes des liposomes peuvent fusionner aussi avec celles des cellules sur lesquelles ils s'adsorbent: il en résulte une intégration des bicouches lipidiques des vésicules dans la membrane cytoplasmique, alors que le contenu liposomal est déversé directement dans le cytoplasme cellulaire (Bienvenue & Philippot, 1985; Karlowsky & Zhanel, 1992; Margolis, 1988; Ostro, 1987). Toutefois, *in vivo*, ce mécanisme serait secondaire et moins important que la phagocytose et les deux seraient les principaux types d'interaction liposomes-cellules. Dans le mécanisme d'échange de constituant lipidiques entre la cellule et le liposome, le transfert intermembranaire peut survenir sans rupture de vésicules. Ce mécanisme a permis de supplémenter ou de soustraire du cholestérol à des membranes cellulaires *in vitro*, mais il reste mal compris (Betageri *et al.*, 1993).

2.4.2 Pharmacocinétique selon les voies d'administration

Les liposomes, en l'occurrence ceux contenant des drogues, peuvent être administrés par plusieurs voies et, après passage dans le sang, ils peuvent être séquestrés par les cellules phagocytaires circulantes et résidentes et par les organes. Cependant, la durée du temps de circulation des liposomes dépendra de leur taille, de leur composition en lipide, de la quantité administrée et de leurs interactions avec les composantes du sang (Karlowsky & Zhanel, 1992; Wassef & Alving, 1993). Ce devenir des liposomes et de leur contenu peut être suivi par l'utilisation de marqueurs moléculaires radioactifs ou fluorescents (Hwang, 1987; Betageri *et al.*, 1993).

2.4.2.1 Administration intraveineuse (IV)

Circulation des liposomes dans le sang

Les liposomes administrés par voie IV sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par les cellules phagocytaires (système réticuloendothélial ou SRE) et par les organes,

particulièrement le foie, la rate et la moelle osseuse. Par ailleurs, les lipoprotéines plasmatiques de haute densité (HDL) s'attaqueraient aux liposomes en altérant leur membranes par soustraction de phospholipides (Gregoriadis, 1988). L'importance de cette clairance dépend de plusieurs facteurs dont: la taille et la quantité de liposomes administrée, leur composition en lipidique et leurs interactions avec les composantes du sang (Wassef & Alving, 1993). Des modifications de structure des liposomes permettent de réduire leur élimination par le SRE et leur altération par les HDL: l'enrichissement des vésicules en cholestérol (Betageri et *al.*, 1993; Gregoriadis, 1988; New, 1993) ou l'incorporation de détergent non toxique comme le Tween 80 (Kronberg et *al.*, 1990) permet d'accroître leur stabilité. L'incorporation de ganglioside GM1, de phosphatidylinositol (PI), de cérébrosides ou de polyéthylène glycol conjugué à un phospholipide constitutif du liposome permet de réduire considérablement la clairance des vésicules par le SRE et de prolonger le temps de circulation dans le sang: ce sont les "Stealth" liposomes (Betageri et *al.*, 1993; Klibanov et *al.*, 1990; Papahadjopoulos & Gabizon, 1995; Woodle, 1993).

Distribution tissulaire

Petits (SUV) et grands liposomes (LUV, MLV) non détruits dans le sang, atteignent les organes après avoir été séquestrés par les cellules phagocytaires circulantes et surtout par les phagocytes résidents du foie (cellules de Kupffer), de la rate et de la moelle osseuse. Les SUV peuvent sortir de la circulation sanguine en diffusant par les espaces intercellulaires des parois capillaires discontinues normales: ils peuvent ainsi être retenus par les intestins et la peau. Par contre, les LUV et MLV ne peuvent diffuser à travers la paroi capillaire que lorsque sa structure est altérée, particulièrement au niveau des foyers d'inflammation (Betageri et *al.*, 1993; Hwang, 1987). La clairance des grands liposomes se fait également au niveau des poumons.

En général, la clairance des liposomes de charge négative est plus rapide que celles des liposomes neutres et positifs (Betageri et *al.*, 1993; Hwang, 1987). Et à de faibles doses, la plupart des liposomes sont retenus par le foie; l'augmentation de la dose peut conduire aux saturations consécutives du foie, de la rate et de la moelle osseuse suivie du SRE. La saturation de ces organes dépend alors de la dose administrée. L'augmentation du taux de cholestérol dans la composition du liposome diminue la rétention des vésicules par le foie (Betageri et *al.*, 1993; Hwang 1995; Karlowsky & Zhanel, 1992).

2.4.2.2 Administration intramusculaire (IM)

Contrairement à l'administration par voie IV, il existe très peu de données dans la littérature sur la pharmacocinétique des liposomes injectés en IM. Les résultats des travaux existants sont parfois contradictoires: certaines expériences font état d'une absence totale de dispersion de la drogue liposomale (Arakawa *et al.*, 1975) ou de libération au point d'injection, du contenu liposomal qui diffuserait lentement dans la circulation sanguine (Cabanes *et al.*, 1995; 1998). D'autres rendent compte d'une bonne diffusion de la drogue sous sa forme liposomale dans les ganglions (Jackson, 1981; Kim & Han, 1995), dans le sang, le foie, les reins, la rate, les poumons, le pancréas, et dans les intestins de rats (Shinozawa *et al.*, 1979; Zierenberg & Betzing, 1979). Cependant, les deux mécanismes pourraient coexister pour une même préparation liposomale avec une prédominance d'un mécanisme sur l'autre qui tiendrait compte de la taille, la composition et la dose liposomale administrée (Naeff *et al.*, 1990). Le temps de circulation des produits liposomaux injectés en IM est prolongé et en général, les liposomes chargés négativement seraient plus lentement dispersés que ceux de charges neutres ou positives (Hwang, 1987).

2.4.2.3 Autres voies d'administration

Intrapéritonéale (IP)

Elle est très douloureuse et peu pratiquée chez l'homme. Le mécanisme de clairance des liposomes injectés par voie IP dépendrait surtout de leurs tailles: les SUV accéderaient à la circulation sanguine en passant par le système lymphatique et ils seraient éliminés par le SRE à des taux 2 ou 3 fois inférieurs à ceux observés après injection par voie IV. Le MLV seraient retenus dans la cavité péritonéale (Betageri *et al.*, 1993; Hwang, 1987).

Sous cutanée (SC)

Tous les types de liposomes injectés en SC pénètrent dans le système lymphatique, mais ceux de charge positive ou neutre pénètrent mieux dans les ganglions proximaux que ceux de charge négative. L'administration SC des liposomes permet d'obtenir une libération prolongée du produit encapsulé (Betageri *et al.*, 1993; Hwang, 1987).

Orale et applications topiques

L'administration orale a été rapportée pour de nombreux produits encapsulés dans des liposomes; cependant les résultats restent très controversés (Betageri et *al.*, 1993; Hwang, 1987). Les liposomes constituent de bons vecteurs pour les produits ophtalmologiques: selon leur taille, leur charge et la nature du produit encapsulé, ils peuvent augmenter la concentration de la drogue de l'ordre de 2,5 à 8 fois dans les compartiments oculaires (Betageri et *al.*, 1993; Hwang, 1987; Marchal-Heussler et *al.*, 1990). Il existe d'autres voies d'application topique des liposomes: les muqueuses des voies orale et nasale, ainsi que la peau (Betageri et *al.*, 1993; Hwang, 1987). Chez la souris, les liposomes administrés par voie pulmonaire, sous forme d'aérosols, s'accumulent bien dans l'organe et la libération de la drogue encapsulée y est prolongée (Abra et *al.*, 1984).

2.5 TOXICITÉ DES LIPOSOMES

Les lipides utilisés dans la préparation des liposomes sont généralement considérés inoffensifs; mais leur combinaison au sein de la structure liposomale peut modifier leur devenir dans l'organisme et les rendre toxiques pour les cellules ou l'organisme vivant auquel ils sont administrés. Plusieurs tests permettent d'évaluer des manifestations toxiques de préparations liposomales *in vitro* et *in vivo*.

2.5.1 *In vitro*

La toxicité *in vitro* peut être évaluée par des tests de viabilité de cellules mises en culture (Campbell, 1983; Layton et *al.*, 1980; Panzner & Jansons, 1979; Parnham & Wetzig, 1993) et des tests d'hémolyse des hématies ou d'agrégation des plaquettes en présence des liposomes (Martin & McDonald, 1976; Yoshihara & Nakae, 1986). Les liposomes négatifs constitués de PC et DCP ou de PC et PS (Panzner & Jansons, 1979) et ceux de charge positive composés de PC et SA (Campbell, 1983) sont toxiques pour les cellules leucémiques L1210 et fibroblastiques normales de souris en culture. Cette toxicité est dose-dépendante et elle est d'autant plus marquée que la densité en charge est importante (Campbell, 1983). Les liposomes contenant des alkyl lysophosphatides ont plutôt une toxicité sélective pour les cellules L1210 (Layton et *al.*, 1980). Ceux contenant certains dérivés synthétiques de PC et surtout du SA provoquent des lyses des globules rouges humains et/ou d'animaux (Nishiya & Chang, 1994; Parnham & Wetzig, 1993;

Yoshihara & Nakae, 1986) ou leur agglutination dans des milieux appauvris en électrolytes (Martin & McDonald, 1976). Les liposomes positifs peuvent aussi entraîner l'agglutination des cellules HeLa, des cellules Vero et les cellules de rein de lapin (Martin & McDonald, 1976).

2.5.2 *In vivo*

La toxicité des liposomes *in vivo* dépend également de leur composition en lipides. L'administration IV prolongée de MLV composés de SM:PC (4:1) ou de DSPC:Cholestérol (1:1) administrés en IV à des souris, provoque des inflammations granulomateuses du foie et surtout de la rate, en relation avec une dépression de l'activité phagocytaire; peu de temps après l'arrêt des injections, la splénomégalie et l'hépatomégalie disparaissent et les fonctions du SRE sont rétablies. Cependant, l'injection des mêmes types de liposomes composés de PC:Cholestérol (2:1), n'entraîne aucun dommage hépatique ou splénique (Allen & Smuckler, 1985). Les liposomes constitués du seul lysophosphatidylcholine (lysoPC) ou contenant ce phospholipide, provoquent également la dépression de la fonction phagocytaire. La déstabilisation de la structure liposomale inhérente à la présence du lysoPC, influence considérablement la reconnaissance et la captation des liposomes par les macrophages (Lutz et *al.*, 1995).

La présence de charge dans les liposomes peut aussi provoquer des effets toxiques: Adams et *al.* (1977) ont montré que l'injection intracérébrale à des souris, de liposomes négatifs composés de lécithine, de cholestérol et de dicétylphosphate ou de liposomes positifs composés de lécithine, cholestérol et de stéarylamine (SA), provoquait des crises épileptiques généralisées et des cas de mort dues à des défaillances respiratoires immédiatement après injection; par contre, aucune toxicité pour le système nerveux n'a été observée chez ces animaux lorsque le dicétylphosphate a été remplacé par l'acide phosphatidique dans les liposomes négatifs ou quand les vésicules étaient constitués seulement de dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). Toutefois, l'administration IV de liposomes rendus négatifs avec l'acide phosphatidique augmente l'agrégabilité des thrombocytes chez le cobaye (Zbinden et *al.*, 1989). L'application cutanée de liposomes négatifs peut entraîner un dessèchement de la peau chez l'homme et la stéarylamine (SA) peut irriter l'oeil de lapin. Les tests permettant d'évaluer ces effets toxiques intrinsèques des liposomes sont de natures très diverses (Parnham & Wetzig, 1993).

En plus de certains problèmes de stabilité physico-chimiques, les effets toxiques intrinsèques observés attestent des inconvénients que peuvent présenter l'utilisation des liposomes chez l'homme et chez l'animal. De plus, l'utilisation pharmaceutique voudrait que la production des drogues encapsulées puisse se faire à grande échelle et respecter des normes de stérilité et reproductibilité des taux d'encapsulation d'un lot à un autre. Mais malgré l'existence de ces inconvénients, un intérêt substantiel peut être tiré des ces membranes biologiques grâce à une bonne sélection des lipides constitutifs des liposomes, l'adaptation de la composition et du type de liposome à préparer à la nature de la drogue à encapsuler et au choix de la voie d'administration.

2.6 APPLICATIONS CLINIQUES DES LIPOSOMES

Des études *in vitro* et *in vivo* chez des modèles expérimentaux ont prouvé les avantages de l'utilisation des liposomes: ils trouvent des nombreuses applications potentielles en médecine, notamment dans le traitement curatif et la prévention des maladies infectieuses (Bakker-Woudenberg & Lokerse, 1991; Lopez-Berestein, 1987; Omri & Ravaoarino, 1998; Popescu et al., 1987; Ravaoarino & Toma, 1993), en cancérologie (Papahadjopoulos & Gabizon, 1995; Weinstein, 1987), en thérapie génique non-infectieuse (Chonn & Cullis, 1998; Cooper, 1996; Tarahovsky & Ivanitsky, 1998) et en toxicologie (Rahman, 1988).

2.6.1 Dans le traitement et la prévention des maladies infectieuses

Les systèmes expérimentaux utilisés pour les évaluations d'activité et d'efficacité thérapeutiques des antimicrobiens comprennent les bouillons de cultures bactériennes, les culture cellulaires et des modèles expérimentaux animaux (Popescu et al., 1987).

2.6.1.1 Infections bactériennes

Inhibition de la croissance bactérienne en bouillon de culture ou en milieu gélosé

Plusieurs études font état de l'amélioration des activités antibactériennes de certains antibiotiques encapsulés dans des liposomes, sur des bactéries en croissance dans des bouillons de culture appropriés (Popescu et al., 1987): Nacucchio et al. (1985) ont montré que l'encapsulation de la pipéracilline dans des liposomes constitués de PC et de cholestérol (selon un ratio molaire de 1:1), protège l'antibiotique contre les β -lactamases, dont celle du

staphylocoque: cette formulation de l'antibiotique a permis d'obtenir une inhibition de la croissance de *S. aureus* à une concentration équivalente à 50 % de sa CMI.

La pipéracilline et la gentamicine encapsulées dans ces mêmes types de liposomes ou le mélange de ces antibiotiques sous forme libre avec des liposomes vides, ont permis d'obtenir des améliorations substantielles de l'inhibition de la croissance de *E. coli* et de *P. aeruginosa* (Nacucchio et al., 1988). Cependant, Antos et al., (1995) ont montré que les isolats cliniques de *P. aeruginosa* réagissent diversement à l'amikacine liposomale, mais qu'ils sont généralement moins susceptibles à cette formulation qu'à l'antibiotique libre: la concentration équivalente de 2 CMI de l'amikacine libre serait nécessaire pour obtenir une inhibition de croissance avec l'amikacine encapsulée dans les liposomes. En utilisant la nétilmicine, la tobramycine et l'amikacine encapsulées dans des liposomes cationiques et anioniques par sonication, Omri et al., (1995) ont obtenu des profils de sensibilités semblables avec *P. aeruginosa* en milieu gélosé: les CMI obtenues avec les antibiotiques libres et leurs formulations liposomales anioniques et cationiques ont été de 2, 16 et 2 mg/L pour l'amikacine, de 2, 1 et 4 mg/L pour la nétilmicine et de 1, 2, et 4 mg/L pour la tobramycine. Hormis la nétilmicine incorporée dans les liposomes anioniques, les CMI des formulations liposomales de ces antibiotiques ont été supérieures ou égales à celles des drogues libres correspondantes. Le traitement de cultures en phase exponentielle de *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *E. coli* et de *S. aureus* par la tobramycine encapsulée dans des liposomes composés de DPPC et de dimyristoyl phosphatidylglycérol (DMPG), a permis de démontrer l'activité bactéricide de cette formulation de l'antibiotique à des concentrations inférieures à la CMI: au bout de 16 h d'incubation, la tobramycine liposomale a réduit la croissance de *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *E. coli* et de *S. aureus* de 84, 10^5 , 129, 166 et de 10^4 fois respectivement (Beaulac et al., 1998).

Par ailleurs, Sanderson et Jones (1996) ont montré que la vancomycine encapsulée dans des liposomes cationiques constitués de DPPC, de cholestérol et de diméthyl dioctadécylammonium bromide (DDAB) est plus active que sa forme libre sur *Staphylococcus epidermidis* et que ces liposomes adsorbés sur des biofilms produits par *S. epidermidis* pourraient avoir des indications médicales potentielles, particulièrement dans la lutte contre certaines infections nosocomiales de matériels de drainage de liquides biologiques ou d'administration intraveineuse prolongée de produits.

Les activités antibactériennes de certaines formulations liposomales d'antibiotiques ont aussi été évaluées sur des cultures de mycobactéries. Gomez-Flores et *al.*, (1996) ont montré que la résorcinomycine A encapsulée dans des liposomes constitués de dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) et de PI (9:1) était 2 fois moins active que sa forme libre sur le complexe *Mycobacterium avium* (*M. avium* - *M. cellulare*) en croissance dans du bouillon de culture: la CMI de la résorcinomycine A étant de 6 µg/mL contre 12 µg/mL pour sa forme liposomale. Tout au plus, Mehta et *al.*, (1993) ont constaté un maintien relatif des activités de la clofazimine et de la résorcinomycine A sur des isolats cliniques et des souches de référence de *M. avium*, *M. cellulare* et de *M. tuberculosis*.

Le mécanisme d'action des antibiotiques liposomaux sur les bactéries en croissance dans des bouillons et les milieux gélosés est mal connu: la fusion des liposomes avec les bactéries, l'augmentation de la concentration en antibiotique dans le culot provenant de la co-précipitation des liposomes et des bactéries en culture sont autant d'hypothèses qui ont été évoquées (Beaulac et *al.*, 1998; Popescu et *al.*, 1987). Cependant, la pertinence de l'utilisation de ces modèles dans la prédiction de l'efficacité thérapeutique semble plus discutable pour les antibiotiques encapsulés dans les liposomes qu'elle ne l'est pour leur forme libre.

Traitement des cultures de cellules infectées par des bactéries intracellulaires

Bonventre et Gregoriadis (1978) ont montré que la dihydrostreptomycine encapsulée dans des SUV composés de PC d'œuf:cholestérol:PA (7:2:1) pénètre plus abondamment dans les macrophages péritonéaux de souris et y exerce une activité bactéricide 40 fois plus importante sur *S. aureus* que l'antibiotique sous sa forme libre. La flucloxacilline libre est habituellement inefficace contre *S. aureus* à l'intérieur des cellules phagocytaires infectées; mais Roesler et *al.*, (1991) ont montré que sa forme liposomale est dotée d'une puissante activité bactéricide contre les *S. aureus* infectant des cellules macrophagiques J 774 de souris. Par ailleurs, Onyeji et *al.*, (1994a) ont rapporté que la vancomycine et la gentamicine encapsulées dans des liposomes sont significativement plus actives que leur forme libre sur des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline infectant des macrophages humains en culture. Cependant, la gentamicine encapsulée dans des REV

(MacLeod & Prescott, 1988), n'a pas permis d'éradiquer *S. aureus* infectant des macrophages mammaires bovins.

La streptomycine et le chloramphénicol encapsulées dans des LUV neutres et anioniques par Stevenson et al. (1983) ont été inactives sur *E. coli* en croissance dans du bouillon de culture; par contre en traitant une lignée de cellules macrophagiques J 774.2 de souris infectée par la même bactérie, les auteurs ont observé des activités bactéricides au moins 10 fois plus importantes avec les formulations liposomales qu'avec les antibiotiques libres correspondants.

L'administration de sulfate de streptomycine encapsulé dans de petits liposomes multilamellaires à des macrophages résidents de souris ou de cobaye infectés par *Brucella canis* ou par *B. abortus*, a permis à Fountain et al. (1985) d'éliminer complètement les bactéries des cellules, montrant ainsi la grande efficacité de la streptomycine liposomale par rapport à l'antibiotique libre.

Desiderio et Campbell (1983a) ont encapsulé la céphalotine dans des MLV composés de PC:cholestérol:PS (6:3:1) et ont montré que cette formulation est plus efficace que l'antibiotique libre dans le traitement de macrophages péritonéaux de souris infectés par *Salmonella typhimurium*: 60% des bactéries intracellulaires ont été éliminées après 1 h d'incubation et plus de 90% après 3 h. Bakker-Woudenberg et al. (1986) ont obtenu des résultats similaires (99% de bactéries intracellulaires tuées) au bout de 12 h en traitant les mêmes types de cellules infectées par *Listeria monocytogenes*, avec une association de 50µg d'ampicilline libre + 100 µg d'ampicilline liposomale. Toutefois, l'utilisation isolée d'ampicilline encapsulée dans des liposomes constitués de PC:cholestérol:PS (4:5:1) et de distéaroyl phosphatidylcholine (DSPC): cholestérol: DPPG (10:10:1) n'a pas produit les mêmes résultats sur la croissance intracellulaire du micro-organisme: la bactéricidie intracellulaire était différée ou absente. De plus, la dégradation intracellulaire des liposomes a semblé dépendre de leur composition en lipides (Bakker-Woudenberg et al., 1988a).

Oneyeji et al. (1994b) ont montré que les macrophages du sang circulant humain en culture accumulent beaucoup plus la clarithromycine et l'ofloxacine encapsulées dans des liposomes que leur forme libre. Lorsque ces cellules infectées par *Mycobacterium avium-M. intracellulare* (MAC) sont traitées par ces antibiotiques, les activités antimycobactériennes des formulations liposomales des 2 antibiotiques sont aussi plus

importantes que celles de leur forme libre. Et une polychimiothérapie associant la forme liposomale de l'un ou l'autre des 2 antibiotiques accroît davantage l'activité bactéricide. Même si la résorcinomycine A liposomale n'est pas plus active que sa forme libre sur les MAC en culture dans du bouillon, son administration à des macrophages péritonéaux infectés par les mêmes micro-organismes à des doses comprises entre 6 et 50 µg/mL entraîne l'inhibition de la croissance de 50 à 93 % de MAC contre seulement 30 à 62 % pour la résorcinomycine A libre (Gomez-Flores et *al.*, 1996). De plus, l'activité antimycobactérienne est maintenue 7 jours après traitement pour la drogue liposomale, contre 3 jours pour sa forme libre. Par ailleurs, Oh et *al.* (1995) ont montré que l'azithromycine et la ciprofloxacine encapsulées dans des liposomes anioniques composés de distéaroyl phosphatidylglycerol (DSPG): cholestérol (10:5) sont respectivement 41 et 43 fois plus efficaces que leur forme libre sur des cellules J774 infectées par *M. avium*. Al-Awadhi et *al.*, (1992) ont montré que la tétracycline encapsulée dans des SUV positifs, négatifs et neutres étaient respectivement 10, 2 et 20 fois plus actifs que la tétracycline libre sur *C. trachomatis* L₂ en culture sur des cellules fibroblastiques de souris *in vitro*.

La plupart des études comparant les activités des antibiotiques liposomaux et de leur forme libre sur les bactéries intracellulaires utilisent des macrophages comme système expérimental. En général, l'encapsulation liposomale des drogues augmente significativement leur activité inhibitrice de la croissance bactérienne par rapport à leur forme libre correspondante. Celle-ci serait liée non pas à l'amélioration des fonctions phagocytaires intrinsèques des cellules, mais à l'augmentation de la pénétration des antibiotiques liposomaux dans ces phagocytes et de la modification de leur distribution dans les sous-compartiments cellulaires (Dees & Schultz, 1990; Stevenson et *al.*, 1983).

Traitement des infections bactériennes in vivo, par les antibiotiques liposomaux

Les formulations liposomales ont été expérimentées *in vivo* pour plusieurs genres bactériens (Bakker-Woudenberg & Lokerse, 1991; Popescu et *al.*, 1987): mieux que les études réalisées *in vitro*, ces systèmes expérimentaux permettent de faire de meilleures prédictions sur l'efficacité clinique des antibiotiques encapsulés dans les liposomes.

Le traitement intramammaire de mastite staphylococcique par la cloxacilline liposomale n'a pas permis à Anderson et Kirby (1986) d'obtenir une amélioration de

l'activité bactéricide de l'antibiotique, malgré la bonne pénétration des liposomes dans les neutrophiles également infectées. De même, la gentamicine encapsulée dans des REV, n'a pas permis à MacLeod et Prescott (1988) d'obtenir une amélioration de l'activité antibactérienne dans le traitement de mastite staphylococcique bovine. Par contre, Huh et *al.* (1998) ont rapporté un taux de guérison significatif ($P < 0,04$) avec l'amikacine liposomale dans le traitement d'infections staphylococciques expérimentales: ils ont réalisé des greffes aortiques expérimentales chez 31 lapins blancs de Nouvelle Zélande qu'ils ont contaminés par application de 10^5 à 10^8 bactéries. Douze des lapins contaminés ont reçu 2,5 mL d'amikacine liposomale alors que les 19 autres n'ont pas été traités. Après 2 semaines d'observation, ils ont constaté 75 % de survie, sans trace de septicémie ou d'infection locale des greffes dans le groupe des lapins traités contre 37 % dans celui des non-traités. L'absence de comparaison avec un groupe de lapins traités par l'amikacine libre ne permet pas de juger d'une amélioration réelle apportée l'encapsulation de la drogue. De plus, l'application locale de la drogue ne tient pas compte de nombreux aléas pharmacocinétiques advenant à l'administration parentérale des liposomes. Par ailleurs, des formulations liposomales de gentamicine et muramyl tripeptide ont été proposées pour les traitements préventifs d'infections staphylococciques post-opératoires de tissus mous (Grayson et *al.*, 1995); le risque majeur de ces applications cliniques des formulations liposomales pourrait être le développement de résistance bactérienne.

L'administration IP de doses uniques (1, 5 et 10 mg) de streptomycine liposomale a permis à Fountain et *al.*, (1985) de réduire de 100 fois le nombre de bactéries vivantes présentes dans les rates de souris infectée par *Brucella canis* par rapport à l'antibiotique libre, mais pas de les éliminer complètement. Par contre, les injections de 2 doses consécutives leur ont permis d'obtenir une élimination complète des bactéries de la rate des souris traitées avec la streptomycine liposomale, contre une réduction de 100 fois le nombre de bactéries avec l'antibiotique libre comparativement aux souris infectées non traitées et celles traitées avec les liposomes vides. Ils ont obtenu des résultats similaires avec l'injection de 2 doses de cette même formulation liposomale à des cobayes infectés par *B. abortus* ainsi qu'à l'administration de gentamicine, de dihydrostreptomycine ou de kanamycine liposomale à des souris infectées par *B. canis*.

Les antibiotiques encapsulés dans des liposomes ont été utilisés pour traiter des infections expérimentales à *Salmonella* chez la souris: Desiderio et Campbell (1983b) ont

comparé les efficacités de la céphalotine libre et de sa formulation liposomale administrées en IV contre *S. typhimurium* chez des souris. Ils ont trouvé une concentration beaucoup plus marquée de l'antibiotique liposomale dans le foie et la rate que dans le sang circulant. De même, l'activité antibactérienne de la céphalotine liposomale était nettement plus importante que celle de l'antibiotique libre dans ces organes. Tadakuma et *al.*, (1985) ont utilisé la streptomycine liposomale pour traiter des souris infectées par *S. enteridis*: l'administration de 20 mg de streptomycine libre par kg de poids 24 h après infection, n'a pas permis de prolonger la survie des souris qui sont mortes entre 5 et 7 jours plus tard comme les souris infectées non traitées. Par contre, la formulation liposomale administrée à cette dose et même à une moindre dose de 1,2 mg/kg de poids, a favorisé une plus importante concentration de l'antibiotique dans le foie et la rate et a permis de prolonger la survie des souris. De plus l'encapsulation de l'antibiotique dans les liposomes a permis de réduire sa toxicité aiguë. Cette plus grande concentration d'aminoglycoside liposomale dans le foie et la rate, leur plus grande efficacité antibactérienne *in vivo* et leur moindre toxicité chez les modèles expérimentaux murins ont été rapportées par Fierer et *al.* (1990) qui ont utilisé la gentamicine encapsulée dans des MLV chez des souris infectées par *S. dublin*. Magallanes et *al.*, (1993) ont montré également qu'une dose unique de ciprofloxacine liposomale administrée à des souris infectées par *S. dublin*, est 10 fois plus efficace que sa forme libre et permet d'obtenir une prolongation de survie chez ces animaux. La distribution de la drogue liposomale et l'élimination des bactéries dans les organes infectés étaient dépendantes de la dose administrée. Des résultats similaires ont été rapportés par Webb et *al.* (1998) qui ont également montré que l'amélioration de la pharmacocinétique de la ciprofloxacine encapsulée administrée en IV, en IP, en intratrachéale ou sous forme d'aérosol, varie avec la composition lipidique des liposomes.

Bakker-Woundenberg et *al.* (1985, 1988b) ont montré que l'activité thérapeutique de l'ampicilline liposomale administrée en IV à des souris normales est 50 à 90 fois plus importante que celle de l'antibiotique libre seul ou mélangé à des liposomes vides et que cette augmentation de l'index thérapeutique peut être influencée par la composition lipidique des vésicules: les liposomes dégradés lentement dans les phagocytes sont moins actifs que ceux qui y dégradés rapidement (Bakker-Woundenberg et *al.*, 1989). Cependant, l'ampicilline liposomale n'a pas été efficace chez les souris nues

L'utilisation de gentamicine ou de ceftazidime encapsulée dans des liposomes de circulation sanguine prolongée chez des rats infectés par *Klebsiella pneumoniae* (Bakker-Woundenberg et al., 1995), a permis d'obtenir une augmentation de l'index thérapeutique et une augmentation de survie des animaux infectés par rapport aux formes libres des antibiotiques.

Omri et al. (1994) et Beaulac et al. (1996) ont rapporté que la tobramycine liposomale est plus efficace que l'antibiotique libre dans le traitement de l'infection pulmonaire chronique expérimentale établie chez des rats avec la souche mucoïde PA 508 de *P. aeruginosa*: ces auteurs ont montré l'intérêt de l'utilisation de cette formulation dans le traitement des infections pulmonaires chroniques chez les patients souffrant de fibrose cystique (Beaulac et al., 1996). De même, Assil et al. (1991) ont rapporté l'utilisation plus avantageuse de la tobramycine liposomale que celle de l'antibiotique libre dans les kératites à *P. aeruginosa* chez des lapins.

Plusieurs antibiotiques encapsulés dans des liposomes ont été évalués dans le traitement des infections mycobactériennes, notamment contre le complexe MAC. Ces bactéries multi-résistantes aux antituberculeux, se multiplient essentiellement dans les macrophages résidents des poumons, du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques des sujets infectés: les infections disséminées surviennent très fréquemment chez les malades atteints de SIDA. Selon certaines voies d'administration aux modèles expérimentaux *in vivo*, la clairance des liposomes de la circulation sanguine est réalisée essentiellement par les cellules phagocytaires du SRE qui se trouvent être localisées dans les organes cibles du MAC essentiellement. Bermudez et al. (1990) ont évalué les efficacités de la gentamicine et de l'amikacine liposomales dans le traitement d'une infection disséminée à MAC chez des souris. Après 5 injections IV consécutives de différentes doses de chaque produit à des groupes de souris, ils ont observé une augmentation des activités bactéricides des formulations liposomales dans le sang, le foie et la rate par rapport aux antibiotiques libres correspondants et au placebo. Le même potentiel thérapeutique a été rapporté pour la streptomycine encapsulée dans des MLV qui a permis une réduction des unités vivantes de MAC dans le foie, les poumons et la rate de souris (Gangadharam et al., 1991). Dans une étude clinique préliminaire, Nightingale et al. (1993) ont rapporté l'efficacité de la gentamicine liposomale dans les traitements d'infections opportunistes à MAC chez des patients atteints de SIDA: l'utilisation de la gentamicine liposomale a entraîné une

réduction de 75 % ou plus, le nombre de bactéries dans le sang, sans émergence de résistance des pathogènes à l'antibiotique. Metha (1996) rapporte que la clofazimine liposomale est moins toxique *in vivo* et plus efficace que sa forme libre dans le traitement des infections disséminées à MAC chez la souris. De même, Deol *et al.* (1997) ont montré que l'isoniazide et la rifampicine encapsulées des liposomes "stealth" spécifiques des poumons, sont non seulement moins toxiques que leur forme libre, mais qu'elles possèdent aussi des activités plus marquées contre *M. tuberculosis* tant dans les poumons que dans le foie et la rate des souris infectées.

Les données cumulées sur l'utilisation des antibiotiques encapsulés dans les liposomes, rendent compte de la moindre toxicité et en général, de leur efficacité thérapeutique plus marquée que celle de leur forme libre. Leur cible majeure reste le SRE. Ces différentes caractéristiques mettent en évidence l'importance de leur utilisation potentielle en clinique.

2.6.1.2 Infections virales

La nature de parasites intracellulaires obligatoires des virus fait des liposomes des outils de choix pour la thérapie antivirale: les liposomes ont été utilisés pour véhiculer des immunomodulateurs dans les macrophages afin de les rendre cytolytiques pour des cellules infectées par des virus et pour le transport des drogues antivirales.

Utilisation des liposomes contre les infections virales in vitro

Koff *et al.* (1985) ont montré que des monocytes du sang périphérique humain activés *in vitro* par l'interféron gamma (IFN- γ), par le facteur d'activation des macrophages (MAF: macrophage-activating factor) ou par le muramyl tripeptide libre ou encapsulé dans des liposomes, lysent sélectivement les cellules cibles infectées par le virus herpès simplex de type 1 (VHS-1) ou de type 2 (VHS-2). Les monocytes activés ont lysé beaucoup plus de cellules infectées que les monocytes contrôles non activés. Par ailleurs, ni les lymphokines seules, ni les surnageants de monocytes en culture activés par ces lymphokines n'ont pu détruire les cellules cibles infectées par ces virus. Le processus est reproductible avec des macrophages péritonéaux de souris BALB/c (cellules 10E2) activés également *in vitro* avec le MAF murin.

Les macrophages jouent un rôle central dans la pathogénèse des infections à VIH, le SRE étant considéré comme un réservoir de dissémination du virus dans l'organisme: ils constituent des cibles privilégiées dans le traitement du SIDA par des formulations liposomales d'antirétroviraux (Desormeaux & Bergeron, 1998). Desormeaux et *al.* (1994) ont montré que la ddI (2', 3'-dideoxyinosine) liposomale est moins accumulée que sa forme libre dans les cellules prémonocytiques humaines U937 et dans les monocytes macrophages murins, RAW 264.7 et que l'efficacité antivirale de la forme libre est plus importante que celle de la formulation liposomale contre la réplication du VIH-1_{III}B dans les cellules U937 en culture *in vitro*. En utilisant les mêmes lignées cellulaires et la même souche virale, Makabi-Panzu et *al.* (1994) ont montré que les cellules RAW 264.7 accumulent la ddC (2', 3' -dideoxycytidine) beaucoup plus sous sa forme liposomale que sous sa forme libre, alors que leur accumulation ainsi que leur activité anti-VIH-1_{III}B sont similaires dans les cellules U937. Selon Dusserre et *al.* (1995), l'accumulation du foscarnet liposomal est plus importante que celle de sa forme libre dans les deux lignées cellulaires et l'activité anti-VIH-1_{III}B un peu plus marquée pour la formulation liposomale.

Utilisation des liposomes contre les infections virales in vivo

L'administration prolongée de 3'-Azido- 3'-deoxythymidine (AZT) à 1200 mg/jour, entraîne une importante toxicité de la moelle osseuse chez près de 50 % des patients atteints de SIDA. Phillips et *al.* (1991) ont montré que l'injection IV de 5 doses quotidiennes consécutives d'AZT à des souris C57BL/6, à des doses comprises entre 0,8 et 50 mg/kg/jour, provoque une toxicité de la moelle osseuse et une déplétion des érythrocytes et leucocytes circulants chez ces animaux: cette toxicité est maximale à des doses quotidiennes supérieures ou égales à 2 mg/kg de poids de souris. Mais l'encapsulation de l'AZT dans des liposomes composés de DPPC:DMPG (10:1) diminue sa concentration dans la moelle osseuse alors qu'elle l'accroît de manière très significative dans le foie, la rate, les reins et les poumons, sans diminution des nombres d'hématies et de leucocytes. Cette souche de souris est sensible à l'infection par le virus de la leucémie murine (MuLV) qui provoque chez elles la suppression des réponses mitogéniques des lymphocytes T et B. Sept jours après l'infection des souris par la souche LP-BM5 du MuLV, les auteurs ont traité les animaux par l'AZT libre ou encapsulée dans de liposomes, à raison de 2 mg/kg de poids de souris, 3 fois /semaine pendant 6 semaines. Quatre et 7 semaines après l'infection

des souris, ils ont évalué les réponses mitogéniques des lymphocytes T et B et ils ont constaté que l'AZT libre protégeait la réponse des cellules 4 semaines. L'évaluation de l'efficacité de l'AZT libre dans la protection de la réponse cellulaire a permis d'observer une protection partielle de la capacité mitogénique des cellules seulement 4 semaines après l'infection des souris, mais pas après 7 semaines. Par contre, l'AZT liposomale a permis de maintenir une réponse mitogénique normale, même 7 semaines après l'infection des souris. L'encapsulation de l'AZT dans des liposomes composés de DPPC:DMPG (10:1) a permis de réduire sa toxicité médullaire et d'augmenter son activité anti-rétrovirale chez un modèle murin d'infection par le virus du SIDA de la souris.

L'administration parentérale (par voie IV ou IP) de ddI (Desormeaux et *al.* 1994), de ddC (Makabi-Panzu et *al.* 1994) ou de foscarnet (Dusserre et *al.*, 1995) sous forme libre ou liposomale à des rats femelles a permis d'observer une amélioration de la pharmacocinétique des formulations liposomales qui s'est traduite par des concentrations plasmatiques d'antiviraux plus élevées et des clairances systémiques 77 à 120 fois inférieures à celles des drogues libres correspondantes. De même, leur accumulation dans les organes du SRE a été considérablement accrue par rapport à leur forme libre.

Kende et *al.* (1985) ont rapporté que l'administration de ribavirine liposomale à des souris provoque une accumulation de drogue 5 fois plus importante que celle obtenue avec une dose identique de l'antiviral non encapsulé dans les liposomes. Le traitement des souris avec 25 ou 50 mg de ribavirine liposomale par kg de poids corporel protège les animaux contre une inoculation de dose léthale de virus de la fièvre de la Vallée du Rift, alors que des doses similaires de ribavirine libre ou de liposomes vides sont sans effet notable. L'encapsulation de la ribavirine permet de réduire sa toxicité et sa dose thérapeutique.

Les antiviraux encapsulés dans des liposomes ont été expérimentés chez plusieurs autres modèles animaux, contre d'autres types de virus pathogènes de l'homme ou des animaux. D'une manière générale, les liposomes ont été utilisés avec efficacité pour faciliter l'activation des cellules phagocytaires afin de leur permettre de détruire efficacement les cellules cibles infectées ou pour faciliter l'accumulation des antiviraux dans les cellules infectées afin qu'ils inhibent directement la réplication des virus infectants (Bakker-Woudenberg & Lokorse, 1991; Koff & Filder, 1985; Popescu et *al.*, 1987).

2.6.1.3 Infections parasitaires et fongiques

Les leishmanioses constituent de loin les infections parasitaires contre lesquelles, les drogues liposomales ont été les plus utilisées. Les *Leishmania* sont des parasites intracellulaires cosmopolites qui infectent les cellules phagocytaires du SRE de l'homme et des animaux. Les drogues de choix utilisées dans le traitement des leishmanioses sont des dérivés de l'antimoine pentavalent: le stibogluconate de sodium ou Pentostam et le l'antimonate de méglumine ou Glucantine. Les souches de *Leishmania spp.* résistantes à l'antimoine sont habituellement sensibles à l'amphotéricine B qui est surtout un antifongique administré contre les mycoses systémiques. Cependant, l'utilisation des dérivés de l'antimoine est limitée par leurs importantes toxicités hépatique, gastrointestinale, cardiaque et rénale. L'amphotéricine B est également toxique pour les reins et peut provoquer plusieurs effets indésirables. De nombreux travaux font état de réductions substantielles de la toxicité et des effets indésirables de ces drogues lorsqu'elles sont encapsulées dans des liposomes de compositions lipidiques diverses. De plus, les formulations liposomales des dérivés de l'antimoine, de l'amphotéricine B (Ambisome[®]) et l'émulsion lipidique de l'amphotéricine B (Abelcet[®]) ont des activités antileishmaniennes nettement plus importantes que celles de leur forme libre, ce qui leur confère un potentiel thérapeutique (Bakker-Woudenberg & Lokerse, 1991; Gangneux et *al.*, 1996; Popescu et *al.*, 1987): des cas de leishmanioses viscérales résistantes au traitement à l'antimoine ont été guéries par l'amphotéricine B chez des patients infectés par le VIH (Torre-Cisneros et *al.*, 1993).

Mellors et *al.* (1989) ont montré que l'INF- γ recombinant (rINF- γ) encapsulé dans des MLV composés de PG:cholestérol (2:1) stimule l'activité anti-*Toxoplasma gondii* des macrophages péritonéaux de souris à une concentration 10 fois inférieure à celle de la forme libre. De plus, l'activation macrophagique induite par rINF- γ liposomale perdure pendant 2 jours contre 1 seul jour pour la forme libre.

Les infections fongiques disséminées sont très fréquentes chez les patients atteints de cancer, de SIDA, maladies auto-immunes, de leucopénies ou soumis à des thérapies immunosuppressives notamment lors des greffes d'organes, chez les grands brûlés, et chez les sujets âgés. Les pathogènes les plus souvent en cause sont les *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, et *Histoplasma spp.* (Benedict & Colagrecó, 1994; Lopez-Berestein & Juliano, 1987). L'amphotéricine B et les dérivés azolés sont actuellement les antifongiques de choix dans

les mycoses systémiques (Lopez-Berestein & Juliano, 1987; Sheehan *et al.*, 1999; Terrell, 1999; Yonga, 1995). Dans une revue de la littérature, Lopez-Berestein & Juliano (1987) ont fait une synthèse des études précliniques et cliniques qui ont porté sur l'utilisation de l'amphotéricine B liposomale, et ont mis en évidence les avantages liées à l'encapsulation de la drogue dans les liposomes de compositions diverses, la réduction de sa toxicité et son activité antifongique plus importante que celle de la forme libre. L'amphotéricine B utilisée sous ses formulations lipidiques disponibles actuellement dans le commerce, trouve un grand succès dans le traitement des infections fongiques disséminées. De même, Mehta *et al.* (1987) ont démontré que l'encapsulation liposomale de la nystatine, un autre antifongique très toxique, permet de réduire sa toxicité et d'accroître son indice thérapeutique dans une candidose disséminée chez un modèle d'infection murin.

2.6.1.4 Les liposomes comme vecteurs vaccinaux

L'encapsulation liposomale de sous-unités protéiques ou de matériel génétique d'agents bactériens, viraux, parasitaires ou fongiques a permis de développer un nouveau concept de la vaccination contre les maladies infectieuses (Alving, 1995; Gregoriadis, 1998). Les formulations liposomales de cytokines ou d'immunomodulateurs synthétiques comme les analogues du muramyl tripeptide ou le monophosphoryl lipide A utilisés comme adjuvants pour stimuler la réponse immunitaire de l'hôte, ont également permis des progrès notoires dans la prévention aussi bien que dans le traitement des maladies infectieuses (Allison, 1997; Lachman *et al.*, 1996).

2.6.2 Autres applications

Les liposomes trouvent des applications dans l'imagerie médicale, le diagnostic et le traitement des cancers (Papahadjopoulos & Gabizon, 1995; Weinstein, 1987), en thérapie génique non-infectieuse (Chonn & Cullis, 1998; Cooper, 1996; Tarahovsky & Ivanitsky, 1998) et dans le traitement des intoxications par les métaux (Rahman, 1988)

2.7 CONCLUSION

Les liposomes représentent des véhicules universels de substances médicamenteuses. De nombreuses études ont démontré que l'encapsulation dans des liposomes appropriés, améliore la pharmacocinétique des drogues, réduit leur toxicité et

accroît leur indice thérapeutique. Ces propriétés sont d'autant plus potentialisées que la formulation liposomale est conçue de manière à cibler spécifiquement une population cellulaire ou un organe. Cependant, certains aspects de la "liposomologie" sont à parfaire: la standardisation de la composition lipidique des vésicules, les techniques de préparation, la stabilité et l'uniformité des liposomes qui devraient pouvoir être produits à grande échelle, sur une dimension industrielle.

3. *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

3.1 BIOLOGIE

Les *Chlamydia* sont des bactéries à Gram négatif dépourvues de peptidoglycane et parasites intracellulaires obligatoires: elles utilisent l'ATP de l'hôte pour la synthèse de leurs protéines (Moulder, 1988). Elles se multiplient selon un cycle de développement qui comprend 2 entités morphologiques principales: le corps élémentaire (CE) et le corps réticulé (CR). Ces micro-organismes sont des pathogènes cosmopolites qui infectent l'homme et les animaux.

3.1.1 Taxonomie

L'analyse des séquences de gènes 16S ARNr a permis à Weisburg et *al.* (1986) de démontrer l'origine eubactérienne des *Chlamydia*. Ces bactéries intracellulaires obligatoires à Gram négatif sont de l'Ordre des *Chlamydiales* qui comporte à l'heure actuelle la seule famille des *Chlamydiaceae* qui elle-même, n'est composée que du seul genre *Chlamydia* (Moulder et *al.*, 1984). Aux espèces *C. trachomatis* et *C. psittaci* initialement décrites sont venues s'ajouter deux autres, *C. pneumoniae* et *C. pecorum* (Fukushi & Hirai, 1992; Grayston et *al.*, 1989; Moulder et *al.*, 1984). Ces 4 espèces se distinguent les unes des autres par des caractères biologiques, antigéniques, génétiques et par leur pouvoir pathogène (De Barbeyrac & Bébéar, 1997; Fukushi & Hirai, 1993; Grayston et *al.*, 1989) qui rendent compte également de la variété au sein des espèces. Les caractéristiques de chacune des 4 espèces sont reportées dans le Tableau I.

L'espèce *C. trachomatis* est divisée en 3 biovars: trachoma, lymphogranuloma venereum (LGV) et pneumonie de la souris (Moulder et *al.*, 1984, 1988). Seules les souches des

Tableau I: Caractéristiques des différentes espèces de *Chlamydia*

Caractéristiques	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pecorum</i>
Biologiques:				
-hôte naturel	Homme	Homme	Oiseaux, mammifères	Bovins, moutons
-cellules cibles	Épithélium conjonctival et urogénital; monocytes /macrophages (LGV)	Épithélium respiratoire	Épithélium respiratoire	Épithélium respiratoire
-Forme des corps élémentaires	Arrondie	En poire	Arrondie	Arrondie
-Inclusions				
*forme et nombre par cellule	Vacuolaire, dense, unique	Ovale, dense	Variable, multiple	Variable, dense
*présence de glycogène	Oui	Non	Non	Non
*synthèse des folates	Oui	Non	Non	Non
Génétiques				
-G+C % chromosomique	41-45	40	39-43	36-39
-% homologie des ADN				
* <i>C. trachomatis</i>	92-100			
* <i>C. pneumoniae</i>	1-7	94-100		
* <i>C. psittaci</i>	1-33	1-8	14-100	
* <i>C. pecorum</i>	1-10	10	1-20	88-100
-Plasmide	Oui	Non	Oui, quelques souches	?
Antigéniques: nombre de sérovars	18 Trachoma: 14; LGV: 4	1	Nombreux	3
Pouvoir pathogène:	Trachome, MST, conjonctivite et pneumonie chez l'enfant	Pneumonie et bronchites; Maladies cardio-vasculaires ?	Anthropozoonose	Zoonose

biovars trachoma et LGV sont pathogènes de l'homme et les réactivités de leur protéine majeure de la membrane externe (MOMP: major outer membrane protein) avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux (mAc) ont permis à Wang et *al.*, (1985, 1990) de les répartir en 18 sérovars. Le biovar trachoma comporte 14 sérovars: A, B, Ba et C plus fréquemment rencontrés dans le trachome et les sérotypes D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J et K responsables d'infections oculaires et génitales. Les 4 autres sérovars (L₁, L₂, L_{2a} et L₃) appartiennent au biovar LGV. Selon leurs affinités sérologiques, ces différents sérovars sont regroupés en 3 sous-espèces ou sérogroupes ou encore groupes complexes: le complexe B (B, Ba, D, Da, E, L₁, L₂, L_{2a}), le complexe C (A, C, H, I, J) et le complexe intermédiaire (G, F, Ia, K, L₃) (Wang et *al.*, 1985; 1990; 1991). Le troisième biovar, celui de la pneumonie de la souris (MoPn), n'infecte pas l'homme: les réactions croisées entre ses antigènes (Ag) et ceux des 2 autres biovars de l'espèce sont très faibles, voire inexistantes. De plus, ses Ag à l'état natif ne sont pas reconnus par les sérums habituellement utilisés pour identifier les *Chlamydia*; toutefois, après dénaturation par le dodécylsulfate de sodium ou après oxydation par le périodate, ils réagissent avec les mAc qui reconnaissent des épitopes de la MOMP des 2 autres biovars (Moulder, 1988). Les analyses phylogénétiques des gènes 16S ARNr dans le genre *Chlamydia* ont non seulement corroboré la grande diversité du genre *Chlamydia*, mais elles ont aussi démontré la position taxonomique inappropriée du biovar MoPn au sein de l'espèce *C. trachomatis* (Moulder, 1991; Stephens, 1990). Le biovar MoPn pourrait être déplacé du genre *Chlamydia* dans un avenir plus ou moins proche. De même, les positions taxonomiques des autres espèces pourrait changer.

3.1.2 Morphologie et ultrastructure des *Chlamydia*

Les examens au microscope électronique de cellules infectées par *C. trachomatis*, ont permis de distinguer 3 types de corps chlamydiens: le corps élémentaires (CE), le corps réticulé (CR) et le corps intermédiaire (CI) (Matsumoto, 1988). Les techniques de purification des corps chlamydiens ont permis d'améliorer les connaissances sur l'ultrastructure de ces micro-organismes (Caldwell, 1975, 1981; Newhall et *al.*, 1982; Tamura et *al.*, 1967).

3.1.2.1 Morphologie et structure des corps chlamydiens

Corps élémentaire (CE)

Le CE est la forme extra et intracellulaires: il est arrondi et de petite taille (0,2 à 0,45 μm). Son cytoplasme contient un noyau dense constitué par l'ADN chromosomique, des ribosomes, des ARN et éventuellement des plasmides. Il est limité par une membrane cytoplasmique et une paroi rigide et épaisse composée d'une membrane interne et d'une membrane externe dont l'organisation apparente les *Chlamydia* aux bactéries à Gram négatif; mais cette paroi ne contient pas de peptidoglycane (Newhall, 1988). La surface du CE est recouverte de projections semblables à des spicules, qui émergent chacune du centre d'une rosette nanométrique de 19 à 20 nm de diamètre (Matsumoto, 1988). Les CE sont les formes infectieuses, mais ils ne se divisent jamais. La morphologie du CE est illustrée dans la Figure 2.

Corps réticulés (CR) et corps intermédiaires (CI)

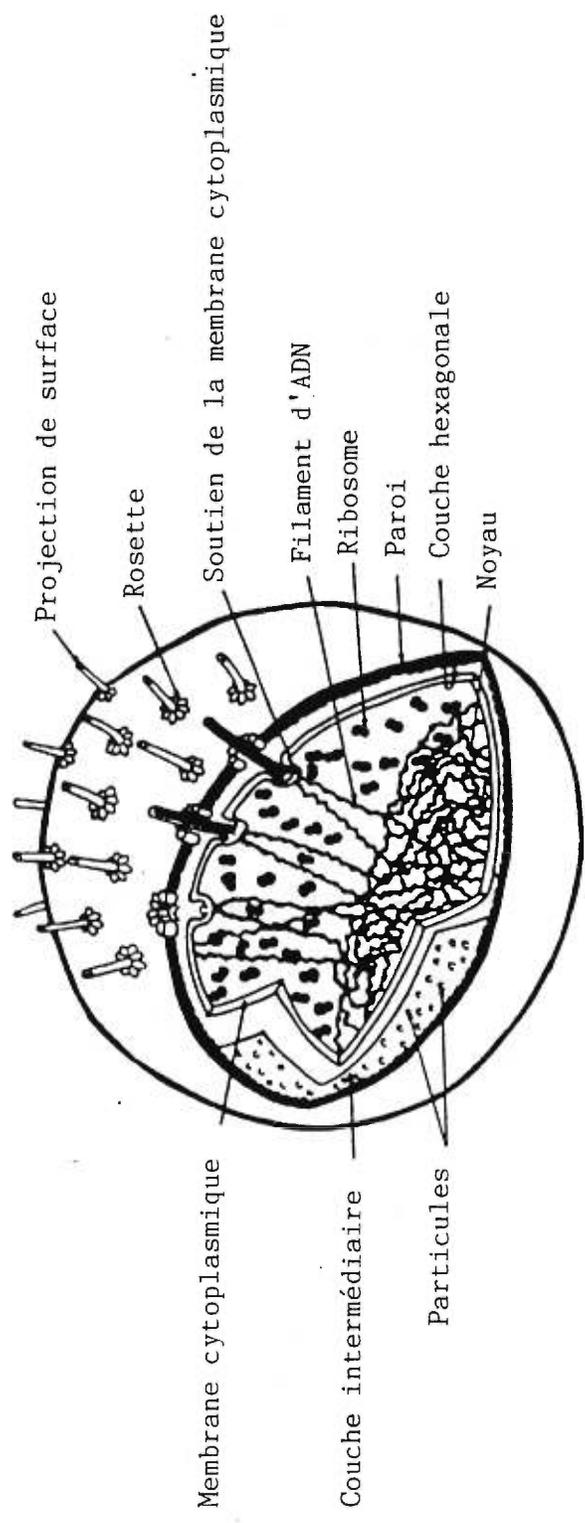
Le CR est plus fragile et de plus grande taille (0,6 - 1,3 μm) que le CE, polymorphe et de contour irrégulier défini par une paroi et une membrane cytoplasmique épaisse de 75 à 80 Å comme celle du CE. Son noyau est aussi moins dense que celui du CE. Son polymorphisme au cours du cycle de développement reflète son activité métabolique. Il n'est pas infectieux. Les CR autant que les CE, sont recouverts de projections tubulaires creuses composées d'arrangement hélicoïdal de sous unités. Chaque projection a une extrémité qui fait saillie dans le cytoplasme, à travers les enveloppes de la bactérie, alors que l'autre est externe et se termine par un bulbe. Leur longueur est de 90 nm chez *C. trachomatis* et varie selon les espèces et les souches chlamydiennes (Chang et al., 1997; Matsumoto, 1988), alors que leur nombre moyen relativement stable pour les CE (17,5 projections) varie selon le temps d'infection de la cellule chez les CR: 44,7 et 20,4 par CR respectivement après 10 h et 20 h d'infection de cellules par *C. psittaci in vitro*.

Les corps intermédiaires (CI) sont intracellulaires et représentent des formes de développement intermédiaires entre CE et CR (Matsumoto, 1988).

La membrane externe chlamydienne

La membrane externe de la paroi comporte 3 protéines riches en résidus cystéine encore appelées protéines de la membrane externe ou outer membrane protein (Omp): Omp1,

Figure 2 : Schéma du corps élémentaire chlamydien
(Matsumoto, 1988)



Omp2 et Omp 3. Elles ont été caractérisées par Caldwell et *al.* (1981), dans des complexes de membranes externes chlamydiennes (CMEC) extraits au sarcosyl. L'Omp1 encore appelée protéine majeure de membrane externe (PMME) ou MOMP pour major outer membrane protein ou encore Omp A, représente 60% des protéines totales de la membrane externe (Caldwell et *al.*, 1981). Sa masse moléculaire déduite par électrophorèse varie selon les souches de 38 à 45 kDa (Newhall, 1988). Les séquençages des acides aminés des PMME de 15 sérotypes de *C. trachomatis* ont montré que ces protéines comportent 5 domaines constants intercalés de 4 domaines variables, DV-1 à DV-4 (Baehr et *al.*, 1988; Stephens et *al.*, 1986; 1987; Yuan et *al.*, 1989). Les DV-1, -2 et -4 sont exposés à la surface du corps bactérien, alors que les extrémités N- et C-terminales de la protéine sont ancrées dans l'espace périplasmique (Baehr et *al.*, 1988). Le DV-3 n'apparaît pas à la surface du corps chlamydien, mais il pourrait être impliqué dans le processus de production des Ac anti-PMME (Allen et *al.*, 1991). Les PMME sont des constituants antigéniques majeurs des *Chlamydia*. Bavoil et *al.* (1984) ont démontré la fonction de porine de la PMME: lorsque ces protéines sont insérées dans des membranes artificielles, elles forment des pores semblables à celles retrouvées dans les membranes externes des bactéries à Gram négatif. Les Omp2 (58 à 62 kDa) et Omp3 (12 à 15 kDa) sont les deux autres protéines de la membrane externe des *Chlamydia* qui sont riches en résidus de cystéine (Caldwell et *al.*, 1981). Leurs tailles et points isoélectriques varient entre biovars LGV et trachoma (Batteiger et *al.*, 1985). En outre, dans le biovar LGV, l'Omp 2 est détectée sous forme de doublet (60 et 62 kDa) dans le profil électrophorétique des protéines totales de CE, alors que le biovar trachoma n'a qu'une seule bande de ladite protéine (Newhall, 1988). Les analyses de leur séquence ont montré que l'Omp2 et l'Omp 3 contiennent respectivement 24 et 13 résidus de cystéine contre 7 à 9 pour l'Omp 1 (Allen et *al.*, 1990; Herring, 1992). L'Omp1 est présente à tous les stades de développement des *Chlamydia*, alors que les Omp2 et Omp3 ne se retrouvent que chez le CE. Les ponts disulfures intra et extramoléculaires de ces protéines riches en cystéine (Omp1, 2 et 3) assurent la rigidité et la remarquable résistance des CE aux agressions mécaniques et osmotiques (Herring, 1992; Newhall, 1988; Raulston, 1995).

D'autres protéines désignées en majorité par leur poids moléculaire seraient associées aux enveloppes chlamydiennes: parmi celles-ci figurent les protéines de 155 kDa, 96 kDa, 45 kDa, 30 kDa, les protéines de stress hsp60 homologue au GroEL (60 kDa) et hsp70

homologue au Dna-K (70 kDa) ainsi que la protéine de 27 kDa homologue au MIP ou macrophage infectivity potentiator de *Legionella pneumophila*. Récemment 12 protéines additionnelles qui seraient des composantes potentielles des enveloppes chlamydiennes ont été caractérisées (Herring, 1992; Lundemose *et al.*, 1991; 1992; Raulston, 1995).

La membrane externe des *Chlamydia* comporte aussi des lipopolysaccharides (LPS) dont la composition chimique est semblable à celle du LPS de mutants Re des entérobactéries. En général, le LPS est une molécule amphipathique dont la partie lipophile est constituée par le lipide A et la partie hydrophile par le polysaccharide (Cavaillon, 1998; Rietschel *et al.*, 1990). Pour les souches bactériennes produisant des colonies "lisses" (smooth: S), la fraction polysaccharidique du LPS comporte des unités répétitives d'oligosaccharides rattachées à un noyau de base ou core qui peut être subdivisé en 2 parties: le noyau interne (portion liée au lipide A) et le noyau externe. Le noyau interne, la région la plus conservée de la molécule, est constitué d'heptoses, de groupements phosphates et surtout d'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (encore appelé 2-kéto-3-déoxy-octonate ou KDO) dont un résidu assure la liaison avec le lipide A. Le noyau de base est identique au sein d'une même espèce, mais varie d'une espèce à l'autre. Le noyau externe encore appelé région des hexoses, est variable et contient du glucose, du galactose et de la N-acétyl-glucosamine sous formes cycliques. Le noyau externe fonctionne comme un récepteur pour les bactériophages core-spécifiques (Cavaillon, 1998). Elle est impliquée dans la liaison des bactéries ou des LPS libres aux récepteurs apparentés aux lectines des lymphocytes T activés: cette interaction jouerait un rôle dans la différenciation des cellules T auxiliaires ou dans l'induction des cellules suppressives et dans l'élimination des bactéries par les lymphocytes (Rietschel *et al.*, 1990). Certaines bactéries à Gram négatif pathogènes de l'homme existent dans la nature sans les chaînes d'unités répétitives oligosaccharidiques caractéristiques des phénotypes lisses: c'est le cas pour *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Acinetobacter calcoaceticus* ou *Bacillus fragilis* (Rietschel *et al.*, 1990). Pour les *Chlamydia*, le LPS n'est constitué que du lipide A et du core interne, ce dernier ne comportant qu'un trisaccharide de KDO qui distingue le LPS chlamydien de celui des autres bactéries (Brade, 1987; Cavaillon, 1998; Nurminen *et al.*, 1985; Rietschel *et al.*, 1990). L'association caractéristique des résidus de KDO est assurée par deux KDO synthétases (Wylie *et al.*, 1997) et une KDO transférase

(Löbau et al., 1995) codées par les gènes *kdsA*, *kdsB* et *kdtA* ou *gseA* (genus specific epitope) respectivement. Le KDO est essentiel à la croissance et à la multiplication des bactéries à Gram négatif et celles qui en sont dépourvues ne sont pas viables. Récemment, Lukacova et al. (1994) ont caractérisé par des techniques d'immunofluorescence utilisant des mAc fluoromarkés, un LPS de phénotype lisse (smooth) chez des souches de *C. trachomatis* (sérovary L₁) et de *C. psittaci* (6BC et PK5082) cultivées surtout dans des jaunes d'oeufs embryonnés, mais aussi dans des cultures de cellules. Par ailleurs, le lipide A de *C. trachomatis* est composé de 5 types d'acides gras (penta-acyl) (Nurminen et al., 1985; Qureshi et al., 1997). Le lipide A permet l'ancrage du LPS dans la membrane externe, alors que la portion polysaccharidique est orientée vers l'extérieur du corps bactérien. Le LPS chlamydien en s'accumulant dans le plasma de la cellule infectée, pourrait rendre celle-ci moins susceptible à l'attaque des cellules T-cytotoxiques en réduisant la fluidité de sa membrane (Karimi et al., 1989). En somme, le LPS chlamydien est constitué de D-glucosamine, d'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (KDO), de phosphates et de longues chaînes d'acides gras normaux et hydroxylés (Nurminen et al., 1985; Qureshi et al., 1997). Son poids moléculaire déduit par électrophorèse est de 10 kDa contre un poids moléculaire calculé de 3 kDa (Brunham & Peeling, 1994).

Outres les protéines et le LPS, la membrane externe comporte aussi des phospholipides. Les analyses par chromatographie en couche mince (CCM) à 2 dimensions des lipides extraits de CE et de CR purifiés de *C. trachomatis* ont permis d'établir la composition de leur membrane externe en phospholipides. Les teneurs des CE et des CR des sérovarys F (UW6/Cx) et L₂ (434/Bu) de *C. trachomatis* figurent dans le Tableau II (Newhall, 1988). Le phosphatidyl éthanolamine (PE) constitue le lipide majeur de la membrane externe de tous les 2 types de corps chlamydiens et avec la phosphatidylcholine (PC), elles constituent plus de 60% des lipides totaux de ces membranes. On y trouve aussi du diphosphatidylglycérol (DPG), du phosphatidylglycérol (PG), du phosphatidylinositol (PI), de la sphingomyéline (SM), de la phosphatidylsérine (PS) et de la lysophosphatidylcholine (lysoPC).

3.1.2.2 Le matériel génétique chlamydien

Il est composé de l'ADN chromosomique, le plasmide et des ARN ribosomiaux (ARNr) messagers (ARNm) et de transfert (ARNt) (Stephens, 1988).

L'ADN chromosomique

L'ADN chromosomique de *C. trachomatis* comprend 1.042 à 1.045 kpb (Birkelund & Stephens, 1992; Stephens et al, 1998), avec une longueur de 342,5 µm et une teneur moyenne en G+C évaluée à 44% (41 à 45%) (Stephens, 1988). Son analyse récente a permis d'identifier 894 gènes codants potentiels de protéines. Des fonctions ont pu être attribuées à 604 (68%) des protéines déduites des séquences de ces gènes et 35 (4%) étaient similaires à des protéines hypothétiques déposées pour d'autres bactéries (Stephens et al., 1998). Les 256 (28%) autres n'étaient pas similaires à des produits de gènes déjà existants dans les banques de gènes. Les *Chlamydia* sont classiquement définies comme étant des bactéries à Gram négatif dépourvues de peptidoglycane et parasites énergétiques des cellules hôtes (Moulder, 1988; Newhall, 1988). L'analyse récente de la séquence du chromosome de *C. trachomatis* a révélé non seulement l'existence de deux ATP/ADP translocatases potentielles, mais aussi l'identification de gènes qui permettraient au micro-organisme de synthétiser une quantité minimale d'ATP pour son propre compte, montrant ainsi que les *Chlamydia* pourraient ne pas être des ATP auxotrophes stricts, ne serait-ce que pour une partie de leur cycle de développement. Par ailleurs, des gènes codant pour la synthèse de protéines impliquées dans la formation du peptidoglycane et l'assemblage de la membrane ont été identifiés dans le génome: les auteurs ont alors suggéré que les *Chlamydia* pourraient synthétiser du peptidoglycane ou une composante similaire, ne serait-ce qu'en faible quantité et dont la fonction pourrait être différente de celle qui lui est connue chez les autres bactéries (Stephens et al., 1998). L'utilisation de sérums polyvalents et d'anticorps monoclonaux permet actuellement de distinguer 18 sérotypes au sein de l'espèce *C. trachomatis*. Des techniques d'analyses moléculaires, notamment par électrophorèse en champ pulsé menée sur des fragments de restrictions enzymatiques des ADN ont permis de caractériser des variations génomiques parmi des souches cliniques et de référence de *C. trachomatis* (Rodriguez et al., 1994). La majorité des travaux faisant état de cette diversité génomique au sein de l'espèce *C. trachomatis* portent sur le gène *omp1* codant pour la synthèse de la PMME (Stephens et al., 1986; 1987): celui-ci comporte 5 domaines constants (DC-1 à 5) entre lesquels 4 domaines variables (DV-1 à 4) sont intercalés. Stephens et al. (1987) ont montré que les divergences en bases entre les *omp1* des biovars LGV et trachoma sont de l'ordre de 6 à 20% contre moins de 1 % pour les gènes *omp2* et *omp3* des mêmes micro-organismes (Allen et al., 1990). En portant

Tableau II: Composition en phospholipides des membranes externes des sérotypes F (UW6/Cx) et L₂ (434/Bu) de *Chlamydia trachomatis* et des cellules HeLa 229 (Newhall, 1988).

Phospholipides	<i>Chlamydia trachomatis</i>			
	F/UW6/Cx	L ₂ /434/Bu		HeLa 229
	CE	CE	CR	
PE	^a 46,6±3,3	43,3±0,8	41,5±0,6	25,0
PC	19,2±0,7	21,8±1,3	27,5±1,0	45,7
DPG	15,2±2,7	13,0±1,7	12,7±0,6	nd
PG	13,1±1,0	12,1±1,2	7,6±0,8	nd
PI	4,1±0,8	4,7±1,5	6,1±1,3	7,7
SM	1,0±0,4	3,0±1,0	2,2±0,1	3,6
PS	4,1±0,8	1,3±0,7	1,1±0,3	5,4
LysoPC	nd	nd	<1,0	5,0

^a:pourcentage de phosphore phospholipidique total; nd: non détectée.

PE: phosphatidyl éthanolamine; PC: phosphatidylcholine; DPG: diphosphatidylglycérol; PG: phosphatidylglycérol; PI: phosphatidylinositol; SM: sphingomyéline; PS: phosphatidylsérine ; lysoPC: lysophosphatidylcholine .

l'évaluation de cette diversité aux niveaux des DV des gènes *omp1*, les différences nucléotidiques entre sérotypes peuvent varier entre 1,6 et 30,1% (Yuan et al., 1989), voire jusqu'à 77% (Dean & Millman, 1997). Les variations génotypiques ont surtout été évaluées dans les DV; cependant, elles affectent également les DC (Dean & Millman, 1997). Yuan et al. (1989) ont trouvé une corrélation entre l'utilisation des Ac polyclonaux et le génotypage pour répartir les souches de *C. trachomatis* en sérogroupes B (B, Ba, D, E, L₁, L₂), C (A, C, H, I, J, K, L₃) et intermédiaire (F,G); toutefois, lorsque cette classification a été établie avec des mAc, les sérovars K et L₃ se sont retrouvés dans le séro groupe intermédiaire (Wang et al., 1985, 1990, 1991; Yuan et al. 1989). Les variations génotypiques surviennent dans tous les sérovars connus et elles seraient dues à des mutations (Dean & Millman, 1997) ou à des recombinaisons génétiques (Hayes et al., 1994), parfois en réponse à une obligation d'adaptation du pathogène à l'hôte (Brunham et al., 1993).

Le plasmide

Les souches de *C. trachomatis* possèdent 5 à 10 copies d'un plasmide cryptique commun de 7,5 kpb, avec un poids moléculaire de 4,5 MDa et une teneur moyenne en G+C de 36% (Palmer & Falkows, 1986; Stephens, 1988). Son séquençage a permis de caractériser 8 ou 9 fragments de lecture ouverte (ORF: open reading frames) qui codent la synthèse de polypeptides (Comanducci et al., 1988; Sriprakash & MacAvoy, 1987). L'analyse comparative des séquences plasmidiques de souches chlamydiennes appartenant aux biovars trachoma (sérotypes B et D) et LGV (L₁ et L₂) de *C. trachomatis* a permis à Comanducci et al. (1990) de démontrer un haut degré de conservation des séquences entre les deux biovars, avec moins de 1 % de variation nucléotidique dans l'ensemble des 8 principaux ORF. Le polypeptide codé par le fragment 8 (ORF-8) s'est révélé complètement conservé entre les sérotypes D et L₂ des deux biovars. Par contre, la comparaison des séquences polypeptidiques de leurs autres fragments majeurs de lecture a montré des substitutions de 1 à 4 résidus d'acides aminés entre les ORF-1, -2 et -6. Deux substitutions de résidus d'acides aminés associées à une mutation majeure à l'extrémité C-terminale ont été détectées entre les polypeptides des ORF-7 des 2 sérotypes: ainsi, le polypeptide codé par l'ORF-7 du sérotype D comportait 305 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 34,8 kDa contre 206 résidus (29,96 kDa) pour celui du sérotype L₂. De tous les 8 fragments de lecture ouverte, l'ORF-3 a présenté la plus grande fréquence de

mutation: 7 des 9 substitutions de résidus d'acides aminés étaient dues à des mutations spécifiques de biovars au niveau de l'ADN. Les séquences d'acides aminés sont bien conservées dans un même biovar, alors qu'elles permettent de caractériser la diversité des plasmides entre les biovars trachoma et LGV (Comanducci et *al.*, 1990). Récemment, Comanducci et *al.* (1993) ont rapporté que le produit du gène ORF-8 est un polypeptide de 28 kDa sans peptide de signal N-terminal qui est synthétisé tardivement au cours du cycle de développement et qui se retrouve en quantité importante dans les préparations de CMEC, même après 3 extractions consécutives par le sarcosyl à 2%: cette protéine pourrait être un constituant de la membrane externe de *C. trachomatis*. Ils ont démontré l'immunoréactivité de ce polypeptide en caractérisant des Ac qui le reconnaissent dans des sérums de patients atteints d'urétrite et d'inflammation pelvienne chronique chlamydiennes (Comanducci et *al.*, 1994). Par ailleurs, le produit de synthèse du fragment ORF-1 présente une grande homologie avec la protéine DnaB de *E. coli* qui suggère l'implication du plasmide dans la réplication du chromosome chlamydien (Comanducci et *al.*, 1988). Des souches cliniques de *C. trachomatis* dépourvues de plasmide et appartenant aux sérotypes L₂ (Peterson et *al.*, 1990), B (Farencena et *al.*, 1997), E (Stothard et *al.*, 1998) et K (An et *al.*, 1992) ont été isolées. Malgré la corrélation trouvée entre le manque de plasmide et l'absence d'accumulation de glycogène chez *C. trachomatis*, Matsumoto et *al.* (1998) ont montré que la possession de plasmide et l'accumulation de glycogène ne sont pas indispensables à la survie du micro-organisme. Le plasmide de 7,5 kpb n'est pas nécessaire au développement et à la virulence de *C. trachomatis*.

Les ARN chlamydiens

Les *Chlamydia* possèdent des ribosomes, des ARNm, des ARNt ainsi que des ARNr de 23S, 16S, 5S et 4S. La comparaison des séquences des gènes de 16S ARNr chlamydiens avec celles des autres familles bactériennes a permis de démontrer l'origine eubactérienne des *Chlamydia* et de les individualiser au sein du monde bactérien (Pettersson et *al.* 1997; Weisburg et *al.*, 1986).

3.1.3 Structures antigéniques de *C. trachomatis*

L'analyse du génome chlamydien a permis d'identifier 894 gènes potentiels de l'ADN chromosomique (Stephens et *al.*, 1998) et 8 *orf* qui codent de protéines (Comanducci

Tableau III: Caractéristiques des principaux antigènes de *Chlamydia trachomatis*

Dénomination	*MMa (kDa)	Localisation	Spécificités antigéniques
-Lipopolysaccharide (LPS)	10	CE, CR	genre
-Protéine majeure de la membrane externe (PMME, MOMP ou Omp-1)	38-45	CE, CR	genre, espèce, sous- espèce, type
-Hsp70 (DnaK)	75	CE, CR	espèce
-Hsp60 (GroEL)	57-60	CE, CR	espèce
-Omp-2	60; 60/62	CE	genre, espèce, type
-Omp-3	12-15	CE	genre, espèce, type

*MMa (poids moléculaire): masse moléculaire apparente.

et *al.*, 1988; Sriprakash & MacAvoy, 1987). Les protéines de structure de *C. trachomatis* qui ont été antigéniquement caractérisées représentent à peine 1% des produits des gènes codants potentiels du micro-organisme (Newhall, 1988; Newhall et *al.* 1982). Ces Ag peuvent être spécifiques du genre, de l'espèce, de sous-espèce et/ou de type (Brunham & Peeling, 1994; Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989). Le Tableau III résume les caractéristiques des principaux Ag qui réagissent fréquemment avec les sérums de malades ou d'animaux infectés par *C. trachomatis*.

3.1.3.1 Le lipopolysaccharidique (LPS)

Le LPS chlamydien a une masse moléculaire apparente de 10-12 kDa, telle que définie par sa mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide, mais sa masse moléculaire calculée est de 3 kDa (Nurminen et *al.*, 1985). Cet Ag est localisé dans la membrane externe des CE et des CR et dans les cellules hôtes infectées. Il est thermostable (résiste au chauffage à 100°C pendant 20 min), soluble dans l'éther et extractible des corps chlamydiens par le désoxycholate de soude et par le lauryl sulfate de sodium. Il est résistant aux nucléases et aux protéases, mais il est détruit par la lécithinase A et le périodate de potassium (Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989). Le LPS chlamydien est un Ag spécifique du genre, mais il possède aussi un déterminant antigénique responsable de réactivité croisée avec le Re-LPS de *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* et *Acinetobacter*. La spécificité antigénique est portée par la partie polysaccharidique du LPS. Les Ac anti-LPS de *C. trachomatis* qui sont produits au cours de l'infection ne sont ni protecteurs chez l'homme ou chez l'animal, ni neutralisants dans les cultures cellulaires (Brunham & Peeling, 1994). Le LPS chlamydien peut être mis en évidence par des réactions de fixation du complément (RFC), d'inhibition de l'hémagglutination, d'immunofluorescence (IF) et par des tests ELISA (Black, 1997). Sa fonction d'endotoxine est discutée (Ingalls et *al.*, 1995).

3.1.3.2 La protéine majeure de membrane externe (PMME)

Cet Ag de masse moléculaire variant entre 38 et 45 kDa selon les souches de *C. trachomatis*, est présent dans les CE et les CR et elle constitue 60 % de la masse protéique de leur membrane externe (Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989). La PMME est thermostable (résiste au chauffage à 100°C pendant 10 mn ou à 80°C pendant 30 mn), résistante à

l'oxydation periodique, mais il est détruit par la trypsine et les protéases. Sa séquence en acides aminés comporte 4 domaines variables (DV-1 à DV-4) intercalés entre 5 domaines constants (DC-1 à DC-5). Ces domaines sont les sièges des spécificités de genre, d'espèce, de sous-espèce et de type (Conlan et *al.*, 1988; Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989; Stephens et *al.*, 1982; Yuan et *al.*, 1989) qui attestent de la diversité antigénique de la PMME. Celle-ci contient les épitopes majeurs de la neutralisation des CE chlamydiens: des mAc orientés contre les DV protègent passivement les souris contre une infection chlamydienne mortelle, neutralisent l'infectivité du pathogène pour les yeux de singes et dans des cultures cellulaires *in vitro* (Rank & Bavoil, 1996). Les Ac anti-PMME de *C. trachomatis* peuvent être mis en évidence par des techniques d'IF, ELISA, et d'immunoblot (Puy et *al.*, 1989).

3.1.3.3 La protéine de choc thermique Hsp70

Cet Ag de masse moléculaire de 75 kDa appartient à la famille des Hsp70 (Birkelund et *al.*, 1989; Danilition et *al.*, 1990). Il est présent dans le cytoplasme et les membranes externes des CE et des CR chlamydiens (Birkelund et *al.*, 1990; Raulston et *al.*, 1993; Brunham & Peeling, 1994) et reste à l'intérieur de l'inclusion au cours du cycle de développement (Raulston et *al.*, 1998). En général, les DnaK (Hsp70) participent au pliage et à la translocation des polypeptides. Leur extrémité N-terminale (les 2/3 de la protéine) est la partie la plus conservée et elle contient un site de fixation de l'ATP et des activités ATPase et d'autophosphorylation alors que la partie C-terminale (1/3 de la protéine) comprend le domaine variable de reconnaissance de substrat; cependant, le rôle précis de la protéine DnaK de *C. trachomatis* n'est pas encore connu (Birkelund et *al.*, 1996; Raulston et *al.*, 1993). Il existe plus de 98% d'homologie entre les genes *dnaK* des sérovars D, E, et L₂ (Raulston et *al.*, 1993). La protéine DnaK réagit avec les sérums de sujets infectés par *C. trachomatis* (Birkelund et *al.*, 1989; Brunham & Peeling, 1994) et il contient des épitopes reconnus par des Ac neutralisants de plusieurs sérotypes du micro-organisme dans les cultures cellulaires (Danilition et *al.*, 1990). Les Ac anti-DnaK peuvent être détectés par IF, ELISA et immunoblot.

3.1.3.4 La protéine de choc thermique Hsp60

Cette protéine a une masse moléculaire qui varie entre 57 et 60 kDa. Elle appartient à la famille des protéines de choc thermique de 60 kDa (Hsp60 ou GroEL) de par sa

séquence nucléotidique (Bavoil et *al.*, 1990; Morisson et *al.*, 1989). L'expression constitutionnelle des gènes *dnaK* et *groEL* et leur transcription sont régulées par des facteurs de stress. La protéine GroEL ou Hsp60 est présente dans les CE et les CR; elle se retrouve aussi dans les inclusions au cours du cycle de développement de *C. trachomatis* (Raulston et *al.*, 1998). Cette protéine est extractible des CE, par le sarcosyl ou le dithiothréitol. Elle est phylogénétiquement bien conservée et au sein du genre *Chlamydia*, les séquences en acides aminés des Hsp60 sont identiques à plus de 80%: les homologies en acides aminés varient de 99 à 100% dans l'espèce *C. trachomatis* et de 92 à 94% entre les séquences de *C. trachomatis* et celles de *C. psittaci* et *C. pneumoniae*. Les homologies sont inférieures ou égales à 60% avec les autres bactéries et de 48% avec la Hsp60 humaine (Brunham & Peeling, 1994; Ho & Zhang, 1994; Morrison et *al.*, 1989). L'antigène Hsp60 est une protéine d'hypersensibilité retardée (Morrison et *al.*, 1989). Il constitue un marqueur d'infection chronique ou répétée: il est immunopathogène et il induit la production d'Ac dont la prévalence et les titres sont significativement élevés dans les complications d'infections oculaires (Peeling et *al.*, 1998) et génitales (Arno et *al.*, 1995; Brunham & Peeling, 1994; Brunham et *al.*, 1992; Domeika et *al.*, 1998; Horner et *al.*, 1997; Peeling and *al.*, 1997; Toye et *al.*, 1993, Witkin et *al.*, 1998) à *C. trachomatis*. Ces Ac peuvent être mis en évidence par des techniques d'IF, ELISA, et d'immunoblot.

3.1.3.5 Les protéines Omp-2 et Omp-3

La masse moléculaire de la protéine Omp-2 est variable: elle est de 60 ou 62 kDa pour les souches du biovar trachoma et correspond à un seule bande en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'Omp-2 apparaît sous forme de doublet de 60 et de 62 kDa sur gel de polyacrylamide dans le profil électrophorétique des souches du biovar LGV (Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989). L'Omp-2 est le produit d'un gène dont le messenger polycistronique code une seconde protéine, l'Omp-3: cette dernière a aussi une masse moléculaire apparente de 12 kDa pour les souches du biovar trachoma et de 12,5 kDa pour celles du biovar LGV (Newhall, 1988). Ces 2 protéines riches en cystéine sont synthétisées tardivement dans le cycle de développement du micro-organisme: elles ne sont présentes que dans les CE et ne sont pas exposées en surface.

Elles contiennent des épitopes spécifiques du genre, de l'espèce et de type, mais qui ne sont pas naturellement immunoaccessibles (Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989). Cependant,

l'Omp-2 isolée est fortement immunogénique et capable d'induire une réponse secondaire pour la production d'Ac neutralisants anti-PMME (Brunham & Peeling, 1994).

3.1.3.6 Autres antigènes de *C. trachomatis*

La protéine de 155 kDa, présente à la surface des corps CE et CR chlamydiens, est sensible aux protéases et à la chaleur, mais elle est résistante à l'oxydation periodique. Elle est spécifique de l'espèce (Newhall, 1988; Puy et *al.*, 1989).

La protéine de 32 kDa est la deuxième protéine de liaison spécifique de l'ADN du CE chlamydien. Cette histone encore appelée HctB ou Hc2, a une masse moléculaire apparente qui varie de 23 à 32 kDa selon les sérovars et les biovars. La première histone (Hc1) a une masse moléculaire apparente de 18 kDa. Toutes deux sont cytoplasmiques et pas immunoaccessibles (Brunham & Peeling, 1994; Pedersen et *al.*, 1996).

La protéine de 29 kDa correspond à la Mip chlamydienne et son immunoaccessibilité est limitée; cependant, elle induit des Ac dont les activités neutralisantes de *C. trachomatis* en culture cellulaire dépendent du complément (Brunham & Peeling, 1994). Les protéines Hc2 et Mip constituent des Ag mineurs car elles induisent une réponse immunitaire chez une faible proportion de sujets infectés.

La protéine de 28 kDa encore appelée pgp3, est codée par le fragment *orf 3* du plasmide chlamydien. Cette protéine transcrite tardivement au cycle de développement de *C. trachomatis*, est également antigénique. Sa localisation précise dans les corps chlamydiens n'est pas connue, mais elle induit des Ac spécifiques chez certains sujets infectés (Comanducci et *al.*, 1993).

3.1.4 Cycle de développement

3.1.4.1 Cellules sensibles à l'infection par *C. trachomatis*

Deux types principaux de corps bactériens s'alternent au cours du cycle de développement intracellulaire des *Chlamydia*: le corps élémentaire (CE), forme intra et extracellulaire, relativement inactif métaboliquement, mais infectieux et le CR, forme intracellulaire non infectieuse. Le cycle commence par la pénétration du corps chlamydien dans la cellule hôte: les CE des souches du biovar trachoma infectent les cellules susceptibles de l'épithélium colonnaire et pseudocolonnaire des tissus urogénitaux, oculaires, respiratoires et cardiovasculaires (Moulder, 1991; Ward, 1988). Ceux du biovar

LGV infectent préférentiellement les monocytes surtout, les macrophages en particulier et se propagent vers les vaisseaux lymphatiques. *In vitro*, une grande variété de lignées cellulaires sont utilisées pour la culture de *Chlamydia trachomatis* en particulier les cellules HeLa 229 (dérivées de carcinome du col de l'utérus humain), McCoy (fibroblastes de souris d'origine incertaine), HEP-2 (lignée cellulaire provenant du carcinome de larynx humain) et BHK-1 (fibroblastes diploïdes de hamsters). Des lignées monocytaires humaine (U-937) et murine (RAW264.7) ont également été utilisées avec succès pour la culture de *C. trachomatis* (Chen et al., 1996; Numazaki et al., 1995). Mais contrairement au biovar LGV, le biovar trachoma infecte difficilement bon nombre de lignées cellulaires *in vitro*: la recherche de modèles cellulaires plus sensibles et plus représentatifs de cellules naturellement infectées *in vivo* a conduit à l'expérimentation de nombreux autres types de cellules humaines et animales (Moulder, 1991).

3.1.4.2 Cycle de développement normal

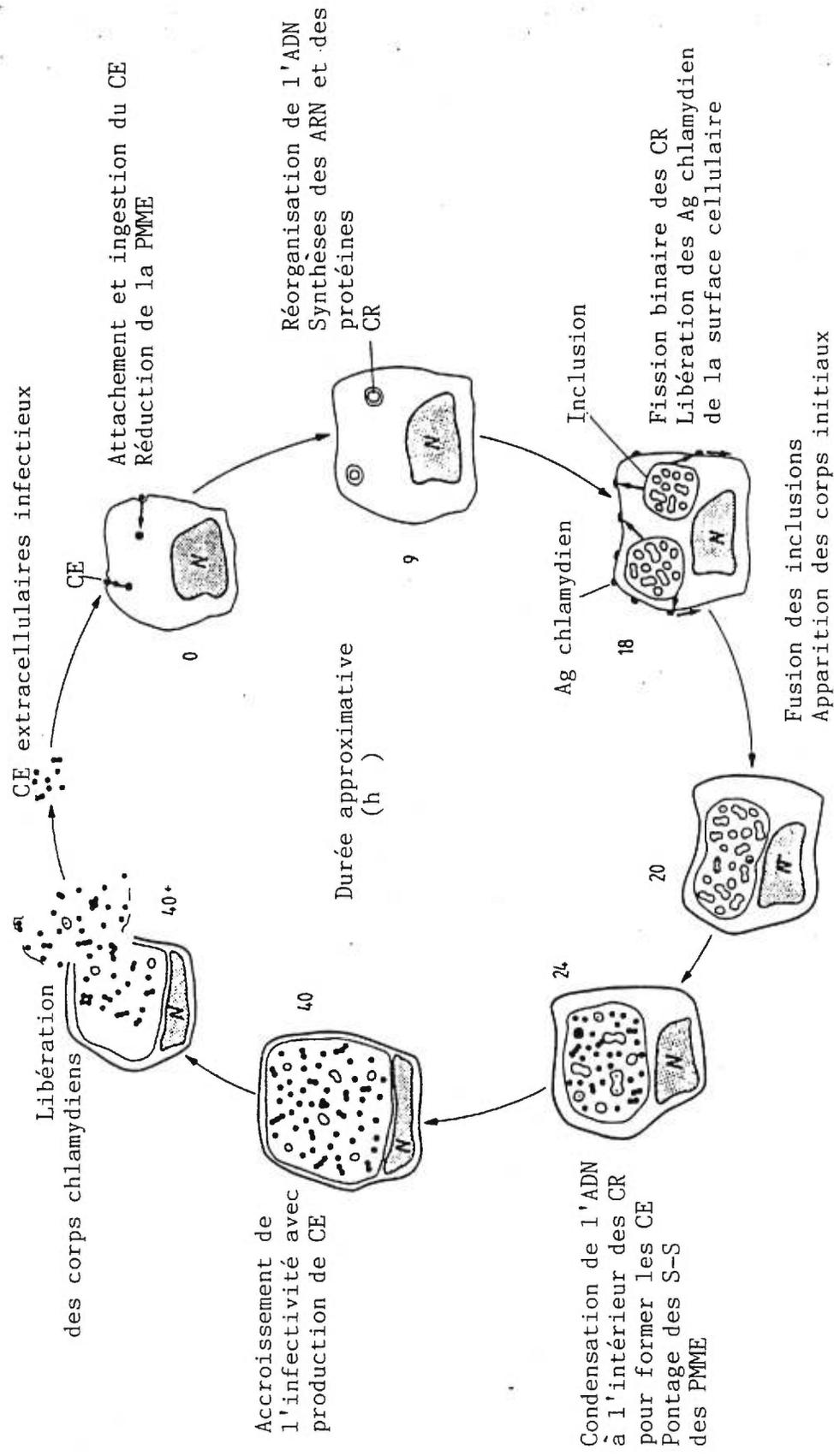
Le cycle de développement des *Chlamydia* est schématisé dans la Figure 3. Il est identique pour toutes les espèces de *Chlamydia* et il peut être divisé en 3 étapes principales: (i) l'entrée du CE dans la cellule hôte, (ii) la différenciation du CE en CR et multiplication des CR et (iii) la réorganisation des CR en CE et libération des CE (Ward, 1988; Moulder, 1991).

Entrée des CE dans la cellule hôte

Seuls les CE pénètrent dans la cellule. Théoriquement, un seul CE suffit pour établir l'infection chlamydienne; cependant, la plupart des cas procèdent de l'infection simultanée d'une même cellule hôte sensible par de nombreux CE (Bavoil et al., 1996), et une infection initiale n'empêche pas la superinfection d'une cellule (Ridderhof & Barnes, 1989): des souches de *C. trachomatis* possédant des recombinaisons de gènes *omp1* ont été isolées chez des patients (Hayes et al., 1994).

Les différences de susceptibilité des cellules hôtes qui existent entre les souches des 2 biovars humains de l'espèce *C. trachomatis* peuvent traduire des différences dans leurs mécanismes d'entrée dans les cellules. Mais au-delà de ces différences, deux caractéristiques communes de leur entrée sont à retenir: (i) ces bactéries pénètrent habituellement dans des cellules qui ne sont pas des phagocytes professionnels et (ii)

Figure 3: Cycle de développement des Chlamydia (Ward, 1988)



l'entrée aboutit à la formation d'inclusion chlamydienne dans le cytoplasme de la cellule hôte (Moulder, 1991). L'étape de la pénétration comprend l'attachement du CE à la surface de la cellule et son internalisation au sein d'une vacuole dans le cytoplasme de la cellule hôte.

L'attachement ou adhésion du CE à la surface cellulaire est influencé par plusieurs facteurs: des facteurs physiques non spécifiques telles la température et les charges de surface des CE et des cellules ainsi que des facteurs spécifiques (Moulder, 1991; Sinai & Joiner, 1997; Ward, 1988, 1995).

Les températures basses (4°C) et élevées peuvent réduire de plus de 90 % l'attachement des CE de certains sérovars aux cellules (Moulder, 1991; Peeling & Brunham, 1991).

Les surfaces des cellules et des CE sont chargés négativement à pH neutre; in vitro, le traitement préalable des feuilletts de cellules HeLa 229 ou McCoy par des polycations comme le diethylaminoethyl-dextran (DEAE-dextran) et la centrifugation à une vitesse approximative de $1.000 \times g$ pendant 1 h augmentent de 10 à 100 fois et de 100 à 200 fois respectivement le pourcentage de cellules infectées par les CE du biovar trachoma, alors qu'ils sont sans effet notable avec ceux du biovar LGV (Kuo et *al.*, 1972; Moulder, 1991). Les polycations permettraient d'éviter les répulsions électrostatiques dues aux charges négatives de surface et la centrifugation aurait pour but d'accroître le contact CE-cellule hôte (Moulder, 1991).

L'attachement des CE aux cellules en culture peut être inhibée par la trypsine (Su et *al.*, 1988), le chauffage (Joseph & Bose, 1991), des anticorps monoclonaux (Peeling & Brunham, 1991) et l'héparine (Zhang & Stephens, 1992). Les ligands impliqués dans l'attachement spécifique du CE comprennent de nombreuses cytoadhésines chlamydiennes dont les glycosaminoglycanes sulfatés (Chen & Stephens, 1994; Zhang & Stephens, 1992), la MOMP (Su et *al.*, 1990) et ses groupements glycanes associés (Su et *al.*, 1996; Swason & Kuo, 1994), l'Omp2 (Ting et *al.*, 1995), la protéine Hsp70 (Raulston et *al.*, 1993) et une protéine de 38 kDa détectée à la surface des CE de sérotypes B, E et L₁ (Joseph & Bose, 1991). L'adhérence des CE aux cellules eucaryotes est multifactorielle et aucun des nombreux ligands ne semble prédominant.

L'internalisation du CE lié à la membrane cytoplasmique de la cellule hôte se fait par endocytose médiatisée par des récepteurs, par pinocytose (Ward, 1988, 1995) et/ou par phagocytose (Zhang & Stephens, 1992), selon la souche chlamydienne et le type de cellule

hôte en cause et les conditions expérimentales (Moulder, 1991; Raulston, 1995; Schramm & Wyrick, 1995).

Différenciation du CE en CR et multiplication des CR

Les CE internalisés dans la cellule hôte se retrouvent dans des vacuoles ou inclusions dont la membrane dérive de celle de la cellule modifiée par la bactérie. La composition exacte de cette membrane n'est pas connue; toutefois, l'analyse du génome de *C. trachomatis* sérotype D a permis à Bannantine et *al.* (1998) de caractériser des gènes codant des homologues de protéines retrouvées dans la membrane des inclusions de *C. psittaci*. Dans le cytoplasme cellulaire, les inclusions chlamydiennes ne fusionnent pas avec les lysosomes; elles migrent dans l'espace périnucléaire, près de l'appareil de Golgi. Lorsque plusieurs CE sont internalisés par la même cellule, les différentes inclusions fusionnent pour donner une seule grande inclusion (Moulder, 1991; Ridderhof & Barnes, 1989): cette fusion d'inclusions homologues requiert la synthèse d'une protéine chlamydienne qui est inactive ou non produite à 32°C (Van Ooij et *al.*, 1998). Quelques heures après son entrée dans la cellule, le CE commence à se transformer en CR au sein de l'inclusion: l'ADN se décondense et devient fibrillaire, les enveloppes perdent leur rigidité par réduction des ponts disulfures des protéines de la membrane externe, le corps chlamydien augmente de taille en passant de 0,45 µm à 1,0 µm et son cytoplasme devient granuleux avec l'augmentation du nombre de ribosomes pour lesquels le rapport ARN/ADN passe de 1/1 à 3/1. Dans les membranes externes des CR, les MOMP existent sous forme de monomères. Huit à 12 h après l'infection des cellules, la quasi-totalité des CE est transformée en CR dont l'une des caractéristiques biologiques est l'absence d'infectivité (Moulder, 1991; Ward, 1988).

Les CR utilisent les ressources énergétiques de la cellule hôte pour assurer la synthèse de leurs macromolécules (ADN, ARN et protéines) et se multiplient au sein du phagosome par divisions binaires. Les précurseurs pour la biosynthèse des acides nucléiques chlamydiens proviennent de la cellule hôte et pourraient être synthétisés par le micro-organisme (Stephens et *al.*, 1998). Les ARN nouvellement synthétisés sont surtout des ARN_r, notamment ceux de 16S, 17,2 S (précurseur des 16S) et de 23S. La synthèse des ARN chlamydiens devient détectable entre 10 et 15 h après l'infection et elle atteint son maximum entre 25 et 30 h après infection avant de décroître. Celle des ADN est assurée par

l'ADN-polymérase ADN-dépendante chlamydienne et elle augmente entre 12 et 40 h avant de décliner (Moulder, 1991; Ward, 1988). Plusieurs transcrits de gènes chlamydiens ont déjà été caractérisés (Moulder, 1991; Ward & Clarke, 1990). In vitro, l'inhibition spécifique de la synthèse protéique de la cellule eucaryote hôte infectée par les *Chlamydia* permet d'accroître les activités métaboliques du micro-organisme: parmi ces inhibiteurs, le cycloheximide est le plus utilisé. Lorsque les feuilletts cellulaires infectés sont traités par des concentrations appropriées de cycloheximide, leur synthèse protéique est réduite de 50 à plus de 90% sans que celle des micro-organismes ne soit affectée. L'utilisation de l'émétine qui agit comme le cycloheximide et l'inhibition des fonctions de l'ADN par l'exposition des feuilletts cellulaires aux radiations ionisantes ou à la 5-iododeoxyuridine sont aussi des stratégies qui permettent d'accroître les activités métaboliques des CR *in vitro* (Moulder, 1991; Ward, 1988). Lundemose et *al.* (1990) ont analysé à des intervalles de temps déterminés, les protéines synthétisées précocement par *C. trachomatis* L₂ en culture dans des cellules McCoy: parmi les 7 protéines de 90, 75, 74, 62, 48, 45, et 39 kDa détectées 2 à 8 h après l'infection et avant la MOMP qui apparaît entre 8 et 10 h après l'infection, 3 ont pu être identifiées et elles correspondent à la protéine ribosomale S1 (74 kDa), et aux protéines Hsp60 (62 kDa) et Hsp70 (75 kDa) chlamydiennes. L'utilisation de cycloheximide inhibe également la synthèse des lipides par la cellule hôte, mais elle n'affecte pas les corps chlamydiens qui produisent des lipides dont certains ne sont pas retrouvés dans la cellule hôte: il s'agit particulièrement des acides gras saturés comportant 15C et 17C et le PG (Moulder, 1991). La transformation des CE en CR est asynchrone et les divisions successives des CR donnent des CR fils de tailles plus ou moins égales: les corps chlamydiens apparaissent polymorphes au sein d'une même inclusion.

Réorganisation des CR en CE et libération des CE

L'infectivité intracellulaire titrable apparaît environ 20 h après l'infection et elle est corrélée par l'apparition des CE qui constituent la majorité des corps chlamydiens présents dans l'inclusion mature et dont le nombre augmente exponentiellement jusqu'aux environs de 40 h post-infection; à ce stade, les inclusions contiennent aussi des CR et des CI. La réorganisation des CR en CE s'accompagne de la condensation de l'ADN chromosomique sous forme de nucléoïde, et de la polymérisation des monomères de MOMP qui confère à la membrane du CE toute sa rigidité (Moulder, 1991; Ward, 1988). Généralement, la durée du

cycle de développement normal des souches de *C. trachomatis* du biovar LGV est de 48 h et de 72 h pour celles du biovar trachoma. *In vitro*, une cellule infectée peut contenir entre 100 et plus de 1.000 CE infectieux; cependant, l'estimation n'est pas connue pour les cellules infectées *in vivo* (Moulder, 1991; Ward, 1988, 1995).

A forte dose infectante, les corps chlamydiens intracellulaires sont le plus souvent libérés dans le milieu extracellulaire après éclatement des membranes des inclusions et de la cellule hôte. Toutefois, leur relargage peut se faire au sein d'une inclusion intacte, notamment avec de faibles doses infectantes (Ward, 1988; Ward & Clarke, 1990). *In vitro* et en présence de cellules intactes, les CE libres du biovar LGV peuvent initier de nouveaux cycles infectieux contrairement à ceux du biovar trachoma (Moulder, 1991).

D'importants progrès ont marqué l'étude de la biologie des *Chlamydia*; cependant de nombreuses interrogations demeurent. Quelle est la composition de la membrane des inclusions? Quelles composantes intracellulaires fournissent le signal pour la transformation des CE en CR et comment celui-ci est transmis au CE contenu dans les phagosomes? Quels sont les mécanismes exacts de régulation de la réorganisation des CR en CE?

31.4.3 Altération du cycle de développement et persistance

Le cycle productif peut être interrompu par l'altération des conditions de croissance et de développement du micro-organisme. Cette altération se traduit par un retard de maturation des CR, une inhibition de leur différenciation en CE infectieux, et par une apparition de formes chlamydiennes aberrantes, atypiques, viables qui persistent dans les cellules hôtes mais qui ne sont pas facilement cultivables (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991). La réduction de l'activité métabolique inhérente à l'altération des conditions normales de croissance et de développement affecte aussi les caractères antigéniques des micro-organismes persistants et les rendent indétectables par certaines méthodes usuelles de diagnostic, notamment les techniques de coloration (Beatty et al., 1994). La persistance peut survenir *in vitro* et *in vivo*, sous l'influence de divers facteurs et elle est différente de l'infection asymptomatique (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991; Ward, 1988). Toutefois, lorsque les conditions redeviennent normales, le développement des corps chlamydiens atypiques peut être réactivé et aboutir à un cycle productif.

Persistence in vitro

Plusieurs systèmes de culture cellulaire ont été établis pour caractériser les facteurs nécessaires à la croissance des *Chlamydia* et à l'induction d'infections chlamydiennes persistantes. L'infection persistante de culture cellulaire par *C. trachomatis* a été rapportée pour la première fois par Lee et Moulder (1981): après élimination du cycloheximide du milieu de culture, ces auteurs ont pu maintenir pendant 100 jours dans des cultures de cellules McCoy infectées, les micro-organismes sous des formes altérées, viables mais cryptiques car non reconnaissables au microscope optique. La cure complète des infections persistantes par la minocycline (à 10µg/mL de milieu de culture, pendant 5 jours), indiquent que la transcription de l'ADN chlamydien et la traduction des ARNm se poursuivaient dans ces formes microbiennes atypiques.

La persistance peut être induite *in vitro* par plusieurs facteurs dont certaines déficiences en nutriments, les antibiotiques et les cytokines (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991).

L'aboutissement du cycle de développement des *Chlamydia* en culture *in vitro* dépend de l'issue de la compétition entre les micro-organismes et la cellule hôte pour l'assimilation des métabolites. En routine, l'utilisation d'un inhibiteur de synthèse des macromolécules par les cellules eucaryotes hôtes permet de rendre disponibles les nutriments et métabolites divers pour les micro-organismes, orientant ainsi le cycle vers un développement productif. Mais si malgré l'inhibition du métabolisme de l'hôte certains acides aminés sont omis dans le milieu de culture, le cycle de développement peut être altéré. Allan et Pearce (1983) ont évalué l'effet de la déplétion du milieu de culture en chacun des 13 acides aminés testés sur la multiplication de 11 souches appartenant à 10 sérotypes distincts de *C. trachomatis*: la valine et l'histidine étaient nécessaires pour la croissance de toutes les souches testées et à l'examen microscopique des feuillets colorés par le Giemsa, leur manque se traduisait par l'absence totale d'inclusion détectable ou par des inclusions de plus petites tailles. Et parfois, quand bien-même les inclusions étaient de tailles normales, le développement des corps chlamydiens restait bloqué au stade de CR. La glutamine, la leucine et la phénylalanine étaient indispensables au développement de la majorité des souches alors que l'omission de l'arginine, la cystéine, la lysine ou de la thréonine était sans effet. Dans une autre étude ultérieure, Allan et al. (1985), ont montré que l'omission de la cystéine dans le milieu de culture retardait la différenciation des CR des 11 souches appartenant aux mêmes 10 sérotypes de *C. trachomatis* en CE infectieux

dans une culture de cellules McCoy. L'absence de la cystéine affecte la synthèse des protéines de structure des membranes chlamydiennes qui en sont riches et dont la production accompagne la différenciation des CR en CE infectieux (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991; Ward, 1988). L'apport de cystéine restaure le cycle de développement productif.

Le traitement par la pénicilline de cellules infectées par les *Chlamydia* n'a pas d'effet sur la différenciation des CE en CR, mais empêche la division binaire des CR et provoque ainsi la formation de corps chlamydiens anormaux dont les tailles peuvent atteindre 3 μm contre 1 à 1,3 μm pour les CR typiques (Kramer & Gordon, 1971). Cette action de la pénicilline, semblable à celle de l'ampicilline, est inhérente à l'inhibition de la synthèse des protéines de structure de la membrane externe Omp2 (60 kDa) et Omp3 (12 kDa), riches en résidus de cystéine (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991; Ward, 1988). Lorsque le chloramphénicol ou la chlortétracycline est ajouté tôt aux cellules infectées, la différenciation des CE en CR est bloquée. L'addition de chloramphénicol ou de chlortétracycline aux cultures cellulaires, tôt au cours de l'infection chlamydienne, entraîne un blocage de la différenciation des CE en CR, alors que l'addition tardive provoque le blocage de la division binaire et de la différenciation des CR (Beatty et al., 1994; Kramer & Gordon, 1971; Moulder, 1991). Clark et al., (1982) ont montré que la différenciation des CE en CR est bloquée lorsque l'érythromycine est ajoutée 12 h après l'infection des cellules; si l'addition a lieu entre 18 h et 24 h après infection, il y a plutôt blocage de la différenciation des CR en CE avec formation de CR atypiques de plus grandes tailles. Par contre au delà de 24 h d'infection, l'addition de l'antibiotique est sans effet. Les effets d'autres antibiotiques sur l'altération de la morphologie et du cycle de développement des *Chlamydia* ont été rapportés (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991). En général, ces effets semblent dépendre du stade du cycle de développement auquel les antichlamydiens sont ajoutés aux cellules infectées en culture. À certains stades, l'inhibition peut être levée par l'élimination de l'antibiotique.

Plusieurs cytokines sont impliquées dans l'inhibition de la croissance des *Chlamydia* et dans l'établissement d'infections chlamydiennes persistantes (Beatty et al., 1994; Chen et al., 1996; Moulder, 1991; Sarov et al., 1991): parmi celles-ci, l'INF- γ est le plus étudié. La production de cette cytokine est induite par les *Chlamydia* et elle peut en retour inhiber leur croissance. Le traitement à l'INF- γ des cellules phagocytaires

mononucléées, de cellules épithéliales ou de fibroblastes infectées par *C. trachomatis*, provoque le développement de formes chlamydiennes atypiques de grandes tailles et morphologiquement semblables à celles obtenues avec la pénicilline (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991). Cette altération morphologique s'accompagne de modification de l'expression de certains antigènes (Ag) chlamydiens: synthèse continue de Hsp60 (Ag immunopathogène) et réduction de la production de MOMP (Ag protecteur), de LPS et de la protéine d'enveloppe de 60 kDa (Beatty et al., 1994). La persistance induite par l'INF- γ peut être maintenue pendant plusieurs semaines. L'INF- γ inhibe la croissance de *C. psittaci* dans les cellules épithéliales et dans les macrophages (Paguirigan et al., 1994) humains en induisant la synthèse d'une enzyme qui catalyse la dégradation du tryptophane, l'indoleamine 2, 3 -dioxycgénase (IDO). L'infection chlamydienne persistante est induite par de faibles concentrations d'INF- γ (< 200 U/mL); l'élimination de la cytokine ou l'addition de tryptophane au milieu de culture permet de réactiver les corps chlamydiens persistants dans les cellules et la production de CE infectieux. Par contre, le traitement des cellules par de fortes concentrations d'INF- γ (> 400 U/mL), surtout 24 h au moins avant l'infection, provoque un blocage définitif de la croissance des micro-organismes (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991; Sarov et al., 1991). L'effet inhibiteur de la croissance chlamydienne est plus marquée avec l'INF- γ qu'avec les INF- α et - β (Moulder, 1991; Sarov et al., 1991). Récemment, Chen et al. (1996) ont montré que le traitement par l'INF- γ d'une lignée primaire de cellules macrophagiques murines (RAW264.7) infectée par *C. trachomatis*, entraîne l'inhibition de la multiplication du micro-organisme par la production d'oxide nitrique. Le développement productif des corps chlamydiens est restauré par l'addition de N-mono-méthyl-L-arginine, mais pas par le tryptophane, même lorsque celui-ci est ajouté à des concentration de 1000 μ g/mL de milieu de culture. Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) aussi peut jouer un rôle dans l'altération de la croissance des corps chlamydiens (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991; Sarov et al., 1991).

Persistence in vivo

C. trachomatis est responsable d'infections génitales, oculaires, pulmonaires et cardiovasculaires chez l'humain (Odeh & Oliven, 1992; Schachter, 1978, 1990). La notion d'infection chlamydienne latente a été évoquée par de nombreux auteurs au regard de

l'évolution clinique de certaines affections associées aux *Chlamydia*, mais au cours desquelles il n'avait pas alors été possible d'isoler le pathogène par la culture.

Dans les infections génitales

Les infections génitales à *C. trachomatis* sont cliniquement inapparentes, ou modérément symptomatiques dans 70 à 80 % des cas chez la femme et les complications subséquentes à la cervicite peuvent engendrer des salpingites qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies inflammatoires pelviennes, de grossesses ectopiques et de stérilité (Cates & Wasserheit, 1991; Faro, 1991; Wetröm & Wölner-Hanssen, 1993). Plusieurs études sérologiques ont fait état d'une association significative entre des titres élevés d'anticorps anti-*Chlamydia* et la stérilité ou les maladies inflammatoires pelviennes (Arno et al., 1995; Domeika et al., 1998; Moore et al., 1982; Peeling et al., 1997; Theijls et al., 1991; Toye et al., 1993); cependant le pathogène viable n'a été que très rarement isolé en culture cellulaire (Shepard & Jones, 1989). Cette grande fréquence des cultures négatives a fait penser que l'organisme pourrait exister sous forme cryptique, persistante dans l'organisme. Campbell et al. (1993) ont détecté l'ADN et/ou des Ag correspondant à la MOMP de *C. trachomatis* dans des échantillons de trompes de Fallope de femmes atteintes de stérilité tubaire et chez lesquelles le micro-organisme n'était pas cultivable. Dans une salpingite expérimentale à *C. trachomatis* produite chez un modèle simien, Cappuccio et al. (1994) ont caractérisé l'ADN du micro-organisme dans les échantillons provenant des organes infectés pour lesquels la culture et les tests immunohistochimiques sont restés négatifs. Phillips et Burillo (1998) ont détecté par microscopie électronique, un mélange de CR aberrants et normaux dans les tissus cervicaux de souris infectées par une souche de *C. trachomatis* du biovar MoPn: ces formes aberrantes détectées seulement 4 jours après l'infection, étaient semblables à celles induites *in vitro* par l'INF- γ ou par une déplétion en nutriment.

Dans une salpingite chlamydienne expérimentale chez un modèle murin, Beale (1997) n'a pu cultiver le micro-organisme dans les échantillons recueillis de 28 à 70 jours après l'infection, alors que la détection de l'ADN est restée positive dans la même période. Et même après administration de produits immunosuppresseurs comme le cyclophosphamide ou l'hydrocortisone, elle n'a pu restaurer le développement productif de corps chlamydiens infectieux *in vitro*.

La plupart des travaux caractérisant les infections génitales persistantes à *C. trachomatis* est fondée sur la recherche de l'ADN et/ou les Ag d'enveloppe du pathogène. Cependant, ni l'ADN, ni la MOMP ne peuvent être utilisés avec certitude pour prouver la viabilité des corps chlamydiens dont ces marqueurs proviennent (Cerin et *al.*, 1991; Holland et *al.*, 1992).

Dans les infections oculaires

C. trachomatis est l'agent pathogène du trachome; mais même en présence de manifestations cliniques sévères, le micro-organisme n'est que rarement identifié par la culture, les techniques immunoenzymatiques ou immunocytologiques dans plus de 20% des cas (Beatty et *al.*, 1994; Holland et *al.*, 1992). Dans une étude réalisée dans un village africain où le trachome est endémique, Ward et *al.* (1990) ont montré que la cicatrisation progressive de la maladie, avec une infection cliniquement inapparente, non productive et non détectable par la culture, indique que les patients portent des formes chlamydiennes anormales dans leurs tissus. La présence de formes chlamydiennes latentes a été suggérée par le fait que des individus qui ont quitté des zones d'endémie où ils ont été infectés et qui n'ont pas développé le trachome depuis l'enfance, font la maladie aiguë des années plus tard (Beatty et *al.*, 1994; Ward et *al.*, 1990). La preuve de la viabilité de ces formes chlamydiennes latentes ou persistantes est apportée par l'identification de l'ADN et surtout de l'ARNr du micro-organisme durant les périodes de cultures négatives dans les écouvillonnages oculaires de trachomateux et de modèles expérimentaux simiens (Beatty et *al.*, 1994; Cheema et *al.*, 1991; Holland et *al.*, 1992).

Dans les arthrites réactives et les infections pulmonaires

Beutler et *al.* (1995) ont détecté l'ARNr 16S de *C. trachomatis* dans des prélèvements synoviaux de patient atteint du syndrome de Reiter alors que la culture et la détection de la MOMP du pathogène ont été négatives. L'examen microscopique des cellules infectées a montré des formes chlamydiennes atypiques et certaines des cellules hôtes colorées par l'hématoxyline-éosine avaient l'apparence de macrophages.

La notion d'infection pulmonaire persistante à *C. trachomatis* a été évoquée avec la réactivation par la cortisone, d'infections inapparentes établies chez des modèles expérimentaux murins (Yang et *al.*, 1983).

L'induction de la persistance est multifactorielle: ces facteurs peuvent être physiologiques de nature hormonale, immunitaire, nutritionnelle (Beatty et al., 1994; Wetröm & Wölner-Hanssen, 1993) ou encore extérieurs comme l'antibiothérapie (Beatty et al., 1994; Kaushic et al., 1998). L'inhibition de ces facteurs peut provoquer la réactivation des corps chlamydiens quiescents et rendre l'infection productive. L'infection génitale gonococcique concomitante est l'un des facteurs de réactivation les plus évoqués sur le plan épidémiologique (Batteiger et al., 1989; Oriel & Ridgway, 1982).

La persistance a des répercussions sur le diagnostic et le traitement des infections chlamydiennes. Les formes bactériennes sont atypiques, dépourvues des Ag qui permettent de les détecter en routine et elles sont difficilement, sinon non cultivables: la conséquence première est que le diagnostic microbiologique peut être négatif. Elle oblige ainsi à recourir à d'autres techniques grâce auxquelles, il est désormais possible d'éliminer les discordances qui existent dans ces circonstances entre l'analyse microbiologique et les manifestations histologiques ou cliniques. Parmi ces techniques figurent la détection des ARNm (Khan et al., 1996; Munoz et al., 1996) ou des ARNr (An et al., 1992; Beutler et al., 1995; Cheema et al., 1991; Holland et al., 1992; Morre et al., 1998b) qui sont des marqueurs de viabilité des corps chlamydiens persistants, et la détection de certains Ag comme la protéine Hsp60 qui continuent d'être synthétisées au cours de l'infection persistante (Beatty et al., 1994; Munoz et al., 1996; Peeling et al., 1998).

Les formes chlamydiennes persistantes ne sont pas aussi sensibles aux antibiotiques que leurs formes normales: quoique leurs activités métaboliques soient réduites, les antibiotiques administrés sous leurs formulations habituelles, ont peu d'effet car ces corps bactériens sont déficients en leurs composantes qui facilitent la pénétration des drogues (Beatty et al., 1994; Moulder, 1991): la cure des infections chlamydiennes persistantes pourrait donc nécessiter de nouvelles molécules ou de nouvelles formulations d'antibiotiques.

3.2 POUVOIR PATHOGÈNE DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

3.2.1 Pathogénèse

L'inflammation et les lésions tissulaires qui surviennent au cours de l'infection chlamydienne sont médiatisés par la réponse immune aux antigènes du micro-organisme

(Brunham & Peeling, 1994). Des observations convergentes faites dans les modèles expérimentaux d'infections chlamydiennes et chez l'homme ont montré que le polymorphisme de la PMME (MOMP) et la protéine Hsp60 sont des déterminants majeurs de cette pathogénèse. La susceptibilité génétique de l'hôte serait aussi un facteur déterminant (Bavoil *et al.*, 1996; Brunham & Peeling, 1994; Stamm, 1999).

3.2.1.1 Polymorphisme de la PMME

La PMME des *Chlamydia* induit des Ac neutralisants et des réponses immunes médiatisées par les cellules T (Brunham & Peeling, 1994; Peeling & Brunham, 1996; Stamm, 1999). Cependant, les mutations qui surviennent assez souvent dans les gènes *omp1* aboutissent à des synthèses de PMME antigéniques variables. Des séquences mosaïques de ces gènes *omp1* peuvent être observées *in vitro* dans des cultures cellulaires infectées par des souches appartenant à des sérotypes distincts, tout comme chez des sujets ayant d'importants taux d'infections. Les variations antigéniques qui résultent de ces modifications génétiques confèrent aux micro-organismes la capacité d'échapper aux défenses de l'hôte. Apparemment, chaque variant infecte des hôtes qui ne possèdent pas d'immunité spécifique du sérovar en question (Peeling & Brunham, 1996; Stamm, 1999). Les variants de sérotypes sont fréquemment mis en évidence dans les infections urogénitales (Dean & Millman, 1997; Frost *et al.*, 1991; Hayes *et al.*, 1994; Morre *et al.*, 1998a) et dans les zones de trachome endémique (Dean *et al.*, 1992; Hayes *et al.*, 1995). Le polymorphisme de la PMME constitue ainsi un facteur favorisant et aggravant de l'infection chlamydienne (Dean *et al.*, 1995; Peeling & Brunham, 1996; Stamm, 1999).

3.2.1.2 Rôle de la protéine Hsp60 dans la pathogénèse

Les lésions tissulaires observées chez l'humain et chez les modèles expérimentaux d'infections oculaires et génitales sont d'autant plus importantes que les sujets infectés sont exposés de manière répétée à *C. trachomatis*. La croissance active du micro-organisme n'est pas nécessaire dans le processus d'altération tissulaire qui par ailleurs, peut être induit par des souches hétérologues (Brunham & Peeling, 1994; Schachter, 1989). Il est alors apparu que la structure antigénique à l'origine des événements immunopathologiques pourrait être commune aux différentes souches chlamydiennes (Brunham & Peeling, 1994). La protéine Hsp60, membre de la famille des GroEL, est synthétisée par *C.*

trachomatis même au cours de la persistance et elle possède des épitopes spécifiques du genre *Chlamydia* en plus de présenter près de 50% d'homologie avec les protéines Hsp60 humaines (Brunham & Peeling, 1994; Stamm, 1999). L'organisme infecté par *C. trachomatis* peut réagir à la présence de cet Ag par la tolérance ou alors par une réponse auto-immune. Une multitude d'études séroépidémiologiques rapportent des prévalences des Ac anti-Hsp60 chlamydiens très élevées chez les sujets souffrant de trachome et de complications d'infections génitales à *C. trachomatis* par rapport à ceux atteints de formes non compliquées. De même, les titres en Ac anti-Hsp60 sont très élevés dans ces cas de complications (Brunham et al., 1992; Brunham & Peeling, 1996; Peeling et al., 1998; Stamm, 1999).

Cependant, on ignore si ces titres élevés d'Ac sont la preuve d'une implication directe et certaine de la protéine Hsp60 dans le processus immunopathologique ou si elles sont tout simplement la réponse à une production continue de la protéine au cours de l'infection persistante (Brunham & Peeling, 1996; Peeling et al., 1998; Stamm, 1999). Récemment, Kol et al. (1999) ont montré que la protéine Hsp60 chlamydienne ou humaine active les fonctions des cellules vasculaires en rapport avec l'athérogénèse les complications des lésions. Par ailleurs, les réponses des lymphocytes B et T aux Ag chlamydiens dont la protéine Hsp60, sont toutes les deux importantes dans l'immunité et la résolution de l'infection (Peeling & Brunham, 1996).

3.2.1.3 La susceptibilité génétique de l'hôte

L'antigène HLA B27 apparaît comme un marqueur de la susceptibilité des hôtes à plusieurs maladies infectieuses. Il est fortement associé au syndrome de Fiessenger-Leroy-Reiter (Peeling & Brunham, 1996). En Gambie (zone africaine de trachome endémique), les Ag HLA des classes I, notamment le sous-type HLA-A*6802, sont plus fréquents chez les patients porteurs de cicatrices trachomateuses que dans les groupes de population contrôle (Conway et al., 1996). Par contre, à Oman la susceptibilité est liée au sous-type HLA-DR16 (HLA-DR2) de la classe II, celui-ci étant très rare en Gambie (White et al., 1997). Chez les femmes souffrant de PID de même que chez des modèles simiens de PID expérimentale, les Ag HLA de classe I apparaissent comme des marqueurs de susceptibilité à la maladie (Peeling & Brunham, 1996; Stamm, 1999).

Cependant, autant dans l'arthrite réactionnelle que dans le trachome et les PID, le(s) mécanisme(s) par lequel(s) les Ag HLA influencent la susceptibilité n'est pas encore connu (Martin & Rosenbaum, 1998).

Les inflammations chroniques et les séquelles immunopathologiques des infections chlamydiennes apparaissent comme la résultante de plusieurs facteurs parmi lesquels le cortège de cytokines liées aux différents types de réponse des cellules T (Th1, Th2) doivent être pris en compte. Les hormones de la reproduction, les œstrogènes en particulier, augmentent la susceptibilité à l'infection chlamydienne chez la femme et chez les modèles animaux d'infections génitales chlamydiennes (Bavoil et *al.*, 1996).

3.2.2 Infections urogénitales: maladies sexuellement transmissibles

3.2.2.1 Chez l'homme

C. trachomatis est la principale cause des urétrites non gonococciques (30 à 75% des cas) et post-gonococciques (plus de 50 % des cas) (Thompson & Washington, 1983; Vizitiu et *al.*, 1989; Zelin et *al.*, 1995). L'urétrite chlamydienne est souvent asymptomatique ou de manifestation discrète et lorsqu'elle est manifeste, les signes apparaissent 10 à 16 j (2-60 j) après la contamination, les pertes sont généralement peu abondantes, blanches ou transparentes et peuvent s'accompagner d'une algiurie et contenir des traces de sang (De Barbeyrac & Bébéar, 1997; Thompson & Washington, 1983; Vanwaeyenbergh, 1993). Les fréquences du portage asymptomatique sont variables: en général, elles sont très faibles en milieux ruraux africains, mais dans les villes, elles sont comparables à ceux des pays industrialisés (Davies et *al.*, 1996; De Schryver & Meheus, 1990; Goeman et *al.*, 1991). *C. trachomatis* et le gonocoque peuvent coexister dans plus de 30% des cas d'urétrites (Lin et *al.*, 1998; Thompson & Washington, 1983; Vanwaeyenbergh, 1993).

Les urétrites chlamydiennes peuvent se compliquer en épидидymites aiguës et en épидидymo-orchites aiguës (Hoosen et *al.*, 1993; Lee et *al.*, 1989; Thompson & Washington, 1983) et en stérilité, cette dernière pouvant être multifactorielle (Hussenet et *al.*, 1993; Munoz et *al.*, 1996; Villegas et *al.*, 1991; Witkin et *al.*, 1995; Wolff, 1995). Le rôle de *C. trachomatis* dans la survenue des prostatites est controversé (Davies et *al.*, 1996; Thompson & Washington, 1983).

3.2.2.2 Chez la femme

L'endocol est le site de prédilection de *C. trachomatis* chez la femme. L'endocervicite chlamydienne est asymptomatique dans 60 à 90% des cas et elle constitue 20 à 50% des cas de cervites microbiennes (Stamm, 1999; Thompson & Washington, 1983; Vanwaeyenbergh, 1993). Les manifestations cliniques de l'infection ne sont pas spécifiques et elles se traduisent généralement par un écoulement mucopurulent, avec un col utérin souvent oedématié, congestif et friable. Les écoulements peuvent être accompagnés de saignements. L'infection est généralement découverte lors d'un bilan gynécologique, d'une enquête sur les MST ou par l'apparition d'une urétrite chez le partenaire. La cervicite chlamydienne peut s'accompagner d'une urétrite: celle-ci peut être asymptomatique également, mais en général elle se traduit par une dysurie et par une pyurie et une culture négative sur milieux usuels de cultures des urines (De Barbeyrac & Bébéar, 1997; Thompson & Washington, 1983; Vanwaeyenbergh, 1993). *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* coexistent dans 20 à 80% des cas de cervicites (Davies et al., 1996; Lin et al., 1998; Thompson & Washington, 1983).

L'infection peut s'étendre au reste du tractus urogénital et se compliquer en endométrite en salpingites, en abcès tubo-ovariens, qui peuvent être révélés par des grossesses extra-utérines ou par une stérilité secondaire (Davies et al., 1996; Faro, 1991).

Le syndrome clinique inhérent à l'infection de l'un quelconque des sites de la partie supérieure de l'appareil génital féminin (utérus, trompes de Fallope, ovaires), à la surface péritonéale et/ou aux organes contigus, est appelé maladie inflammatoire pelvienne ou pelvic inflammatory disease (PID) pour les anglo-saxons (CDC, 1991). L'importance de la grossesse extra-utérine ou l'infertilité augmente avec le nombre d'épisodes de PID. *C. trachomatis* a été mis en évidence dans 5 à 40 % des cas de PID. Des études sérologiques associent le pathogène à plus de 60 % des cas de stérilités tubaires et à plus de 40 % des cas de grossesses extra-utérines (Brunham & Peeling, 1994; CDC, 1991; Davies et al., 1996). À partir des sites utérins, tubaires et/ou ovariens, *C. trachomatis* peut atteindre le foie et provoquer une périhépatite ou Syndrome de Fitz-Hugh-Curtis.

Chez les femmes enceintes infectées, *C. trachomatis* pourrait provoquer des avortements ou être associé à la rupture prématurée des membranes, au travail et à la naissance avant terme, aux poids faibles des enfants à la naissance (moins de 2500 g), à des retards de croissance intra-utérine, à la mortinatalité ainsi qu'à des infections morbides intra-partum et post-

partum de la mère et de l'enfant (McGrégor & French, 1991). Quoique le micro-organisme ait été mis en évidence dans le placenta (Gencay et *al.*, 1997) et dans le liquide amniotique chez des femmes enceintes atteintes d'infections génitales (Pao et *al.*, 1991), des études épidémiologiques plus poussées sont nécessaires pour prouver son lien avec toutes ces complications de la grossesse.

3.2.2.3 Chez l'homme et la femme

La proctite et la pharyngite chlamydiennes sont habituellement associées à l'homosexualité et à la pratique de rapports oro-génitaux (Bauwens et *al.*, 1995; Thompson & Washington, 1983; Vanwaeyenbergh, 1993).

L'infection génitale chlamydienne peut se compliquer en arthrite réactionnelle non spécifique ou Syndrome de Fiessenger-Leroy-Reiter qui consiste en une triade de symptômes: arthrite, uvéite et urétrite (De Barbeyrac & Bébéar, 1997; Thompson & Washington, 1983; Vanwaeyenbergh, 1993).

Par ailleurs, les sujets atteints d'infections génitales peuvent développer une conjonctivite infectieuse ou paratrachome, par autoinoculation à partir d'un foyer génital. L'atteinte oculaire est généralement unilatérale et elle évolue rarement vers la cécité (Vanwaeyenbergh, 1993).

3.2.2.4 La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)

La LGV ou maladie de Durand-Nicolas-Favre, est une MST ulcérateuse qui commence par une ulcération génitale généralement herpétiforme et douloureuse ou par une urétrite, une cervicite ou une proctite. Elle s'accompagne d'une adénopathie inguinale, le plus souvent unilatérale, qui évolue vers la suppuration et la fistulisation, avec une cicatrisation rétractile et mutilante. Les formes génitales sont fréquentes en Afrique, alors que les manifestations rectales sont surtout retrouvées chez les homosexuels masculins dans les pays industrialisés. La maladie est endémique dans certaines zones tropicales de l'Asie du Sud-Est, de l'Inde, de l'Afrique et de l'Amérique du Sud (Schachter, 1988): elle représente 6 à 7 % des causes d'ulcères génitaux chez l'homme et la femme en Afrique du Sud (O'Farrell et *al.*, 1991a, 1991b) et 24 % des MST à Madagascar (Harms et *al.*, 1994). Les souches du sérovar L₁ du biovar LGV de *C. trachomatis* représentaient près de 1 % des

isolats rectaux de *C. trachomatis* à Seattle (USA) entre 1982 et 1991 (Bauwens et *al.*, 1995).

3.2.3 Infections néonatales

Soixante à 70 % des enfants nés de mères atteintes de cervicites chlamydiennes risquent d'être infectés à la naissance lors du passage vaginal (Davies et *al.*, 1996; Faro, 1991). Chez ces enfants, *C. trachomatis* peut coloniser les conjonctives, le nasopharynx, le rectum et/ou le vagin: parmi eux, près de 25 à 50 % développent une conjonctivite et 10 à 20 %, une pneumonie (Faro, 1991; McGrégor & French, 1991) dans la première année de la vie. Dans tous les deux cas, la guérison clinique est souvent spontanée (Vanwaeyenbergh, 1993).

3.2.4 Le trachome et les infections cardiovasculaires

Le trachome est une kératoconjonctivite folliculaire chronique due à *C. trachomatis*. Il commence par une conjonctivite mucopurulente qui peut se compliquer en cécité plus de 20 à 30 ans après l'infection active qui survient habituellement à l'âge de 5 à 10 ans (Schachter, 1988). Le trachome est endémique dans certaines régions chaudes et sèches d'Afrique où les conditions d'hygiène sont précaires. Il est la première cause mondiale de cécité d'étiologie bactérienne (Schachter & Dawson, 1990).

L'espèce *C. pneumoniae* est la plus évoquée dans les maladies cardio-vasculaires (Peeling & Brunham, 1996); mais par le passé, *C. trachomatis* a aussi été associée à des cas d'endocardites dont certaines ont été fatales et de myocardites surtout chez les enfants (Odeh & Oliven, 1992).

3.3 ÉPIDÉMIOLOGIE

Chlamydia trachomatis est la plus importante bactérie responsable de MST dans le monde (Gerbase et *al.*, 1998). Elle est aussi l'agent du paratrachome et surtout du trachome qui est endémique dans certaines régions du globe. Chez les enfants nés de mères atteintes de cervicites chlamydiennes, le micro-organisme peut causer une pneumonie et/ou une conjonctivite (Schachter, 1988, 1990; Schachter & Dawson, 1990).

3.3.1 Incidences et prévalences des MST chlamydiennes

3.3.1.1 Incidences et prévalences

Les estimations mondiales des MST guérissables (sans le chancre mou) en 1995, étaient de 333 millions de nouveaux cas de syphilis, de gonococcies, d'infections chlamydiennes et de trichomonases. Les détails de la répartition des cas selon les régions géographiques et le sexe figurent dans le Tableau IV. Chez les personnes âgées de 15 à 49 ans, les chlamydioses génitales avaient été les MST bactériennes les plus importantes avec 89,1 millions de cas contre 62,2 millions de cas de gonococcies et 12,2 millions de cas de syphilis (Gerbase et *al.*, 1998). La répartition des cas de MST chlamydiennes selon le sexe avait montré 46,38 millions de cas féminins et 42,75 millions de cas masculins; cependant il est admis que chez la femme, 60 à 90% des infections génitales à *C. trachomatis* sont asymptomatiques. Il en ressort que les estimations réelles pourraient se situer bien au delà des valeurs ici rapportées. Les plus grands nombres de nouveaux cas ont été enregistrés en Asie du Sud et du Sud-Est (45,41%) et en Afrique sub-saharienne (17,27%) et en Amérique latine et dans les Caraïbes (11,36%). L'Europe, l'Amérique du Nord et surtout la région australasienne ont enregistré moins de nouveaux cas.

L'incidence des MST dues à *C. trachomatis* au Canada est de 216 cas par an pour 100.000 habitants et leurs prévalences varient entre 5,3 et 25% selon les groupes de population d'étude et les localités (Davies et *al.*, 1996). Aux États-Unis, plus de 4 millions de nouveaux cas surviendraient chaque année (CDC, 1993) et les plus importantes prévalences sont enregistrées chez les adolescentes sexuellement actives. Dans une étude réalisée entre 1994 et 1996, chez des jeunes filles adolescentes âgées de 12 à 19 ans et vivant en ville, Burstein et *al.* (1998) ont rapporté une prévalence de 29,1 % d'infections génitales chlamydiennes, dont 27,5 % pour les seules filles âgées de 14 ans. L'incidence rapportée dans cette étude était de 28 cas pour 1000 personnes, par mois. La prévalence varie de 4 à 10 % chez les hommes asymptomatiques; dans les consultations pour MST, elle varie de 15 à 20 % chez les hommes et elle peut atteindre 40 % chez les jeunes filles adolescentes (Black, 1997).

En Grande Bretagne, la prévalence des infections génitales chlamydiennes avaient augmenté de plus de 5 fois entre 1981 et 1986 (De Schryver & Meheus, 1990); Grun et *al.* (1997), rapportent une prévalence de 2,5 % chez des jeunes femmes âgées de 18 à 35 ans reçues en consultations générales entre 1994 et 1996 en Angleterre. Egger et *al.* (1998)

Tableau IV: Estimation mondiale des incidences des infections génitales à *C. trachomatis* chez les personnes âgées de 15 à 49 ans en 1995 (Gerbase et al., 1998).

Espaces géographiques	^a MST	<i>C. trachomatis</i>		
		Homme (%)	Femme (%)	Total (%)
Asie:				
-Sud et Sud-Est	150,81	20,2 (22,66)	20,28 (22,75)	40,48 (45,41)
-Est et Pacifique	18,52	2,70 (3,03)	2,63 (2,95)	5,33 (6,00)
Afrique:				
-Sub-saharienne	65,03	6,96 (7,80)	8,44 (9,47)	15,40 (17,27)
-Nord et Centre-Est	9,64	1,67 (1,87)	1,28 (1,44)	2,95 (3,31)
Amérique:				
-Nord	13,88	1,64 (1,84)	2,34 (2,62)	3,98 (4,46)
-Latine et Caraïbes	36,13	5,01 (5,62)	5,12 (5,74)	10,13 (11,36)
Europe:				
-Ouest	17,99	2,30 (2,60)	3,20 (3,60)	5,50 (6,17)
-Est et Asie Centrale	17,57	2,15 (2,41)	2,92 (3,28)	5,07 (5,70)
Australasie:				
	1,04	0,12 (0,13)	0,17 (0,19)	0,29 (0,32)
Total	330,65	42,75 (47,96)	46,38 (52,04)	89,13 (100,00)

^aMST:syphilis, gonococcies, infections chlamydiennes, trichomonases. Ces chiffres sont exprimés en millions et ils ne comprennent pas les cas pour lesquels les sexes n'ont pas été rapportés.

rapportent une prévalence de 4,9 % chez les femmes âgées de 20 à 39 ans, en Suède. Dans d'autres pays industrialisés, les prévalences des urétrites masculines chlamydiennes varient entre 3 et 12% chez les sujets asymptomatiques et de 15 à 20 % chez les sujets consultant pour des MST (De Schryver & Meheus, 1990).

Dans les pays en développement, les prévalences des MST chlamydiennes sont très variables, mais elles sont généralement aussi importantes que dans les pays industrialisés. En Afrique, la prévalence varie entre 1,3% et 29% chez les femmes enceintes (De Schryver & Meheus, 1990; Goeman et *al.*, 1991; Mabey, 1996). Elle est de 16,1% chez les femmes consultant pour un planning familial, de 12 à 18 % chez les femmes souffrant de MST ou consultant pour des infections gynécologiques diverses, de 9,6 % chez les femmes stériles au Gabon et de 4,9 à 32,8 % chez les prostituées; chez les hommes, les prévalences des urétrites chlamydiennes varient entre 2 et 19,2 % avec 5 à 8,9 % d'urétrites post-gonococciques (De Schryver & Meheus, 1990; Goeman et *al.* 1991). En Asie, notamment à Singapour, la prévalence est de 30,2 % pour les urétrites, avec 19,2 % d'urétrites post-gonococciques et de 10 % chez les prostituées; elle est 8,8 % pour les urétrites masculines en Iran et de 1 % dans les consultations gynécologiques en Chine (De Schryver & Meheus, 1990). La prévalence de la lymphogranulomatose vénérienne varie entre 1 et 12 % en Afrique, et la région occidentale est moins affectée que la région australe (Goeman et *al.*, 1991).

Bien que les incidences soient estimées à la baisse dans les pays industrialisés (CDC, 1993; Egger et *al.*, 1998), les MST chlamydiennes constituent encore un problème de santé publique dans le monde. Leurs complications et leurs séquelles font d'elles des causes importantes de morbidité et de mortalité. En Afrique, les milieux ruraux sont moins touchés que les centre urbains.

3.3.1.2 Facteurs influençant l'épidémiologie des MST chlamydiennes

Plusieurs facteurs très imbriqués entre eux, influencent l'épidémiologie des MST chlamydiennes dans une région ou une population donnée. Les principaux facteurs sont cités dans le Tableau 5 (Goeman et *al.*, 1991). Partout dans le monde, les jeunes de moins de 25 ans, sexuellement actifs et vivant dans les villes sont les plus affectés par les infections génitales chlamydiennes (CDC, 1993; Davies et *al.*, 1996; Gerbase et *al.*, 1998; Goeman et *al.*, 1991; Grun et *al.*, 1997). Dans les pays industrialisés, les abus sexuels à

- Tableau V: Facteurs influençant l'épidémiologie des MST chlamydiennes (Goeman et *al.*, 1991; ONUSIDA/OMS, 1997)
-

1. Facteurs sociodémographiques:

- Explosion démographique, proportion d'adolescents et de jeunes adultes dans la population et ratio hommes/femmes.
- Urbanisation et migration

2. Comportement sexuel:

- Prostitution
- Fréquence de changement de partenaire
- Abus sexuels des enfants

3. Facteurs économiques:

- Pauvreté, chômage
- Dot élevée

4. Facteurs politiques:

- Instabilité politique
- Priorité accordée aux infections chlamydiennes
- Guerres (conflits armés)

5. Facteurs médicaux:

- Accessibilité et acceptabilité des services de santé
- Automédication ou traitement inapproprié
- Contraception orale

6. Facteurs éducatifs et culturels:

- Connaissance insuffisante des MST et leurs conséquences
 - Utilisation de préservatifs
 - Comportement vis-à-vis de la santé
-

l'endroit des enfants sont à prendre en compte surtout lorsque la prévalence est déjà importante chez les abuseurs (Robinson et *al.*, 1998). Les régions politiquement instables ou affectées par les guerres sont souvent des foyers de fortes prévalences de MST chlamydiennes (De Schryver & Meheus, 1990; Goeman et *al.*, 1991). Dans les pays en développement, l'accessibilité aux soins médicaux, la méconnaissance des chlamydioses génitales, les faibles priorités qui leur sont accordées et la pauvreté sont de très importants facteurs qui influencent la prévalence des MST chlamydiennes (CDC, 1993; Goeman et *al.*, 1991; ONUSIDA/OMS, 1997). L'absence de symptômes et l'évolution de l'infection à bas bruit surtout chez les femmes, les partenaires sexuels multiples, les réinfections, l'inaccessibilité aux soins, les traitements inappropriés, les tabous sur la sexualité sont autant de facteurs qui peuvent favoriser les survenues de complications de ces MST (Goeman et *al.*, 1991).

3.3.2 Incidences et prévalences des infections oculaires

Le trachome est la principale cause de cécité évitable dans le monde. Il sévit à l'état endémique dans 49 pays, particulièrement en Afrique, mais aussi en Méditerranée orientale, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental. Le pathogène se transmet par contact avec les sécrétions oculaires des sujets infectés (sur les mains, les serviettes ou mouchoirs, etc...) et avec les mouches porteuses du microbe. L'OMS estime le nombre des cas de trachome évolutif à près de 146 millions et entre 5,6 et 6 millions le nombre d'aveugles dans le monde (OMS, 1997; 1999). La maladie serait en baisse dans certaines zones d'hyperendémie comme la Gambie où la prévalence du trachome actif chez les personnes de 0 à 14 ans est passée de 10,4 % en 1986 à 4,9 % en 1996, soit une réduction de 54 %. Dans cette même zone, les cas de cécité dus au trachome sont passés de 17 % en 1986 à 5,6 % (Dolin et *al.*, 1998). En Arabie Saoudite, les prévalences du trachome en général, du trachome actif en particulier, des cicatrises conjonctivales et des trichiasis sont passées de 22,2 %, 6,2 %, 17,4 % et 1,5 % respectivement en 1984 à 10,7 %, 2,6 %, 8,1 % et 0,2 % respectivement en 1994, montrant ainsi une réduction du trachome sous toutes ses formes (Tabbara & Al-Omar, 1997). Stocks et *al.* (1994) ont aussi rapporté une baisse de la prévalence du trachome actif à 17,6 %, des cicatrises conjonctivales à 25,2 % et de la cécité binoculaire en Australie, entre 1989 et 1990. La prévalence est de 10,87 % en Chine (Zhang et *al.*, 1992a). Le trachome est endémique dans de nombreux autres pays comme le

Népal, le Kenya, la Tanzanie, l'Afrique du Sud et l'Égypte, avec parfois des estimations alarmantes pour le futur (Schachter & Dawson, 1990). Malgré les baisses importantes de prévalences observées dans plusieurs zones d'endémie du trachome dans le monde, cette maladie reste un grave problème de santé publique. Les souches de *C. trachomatis* identifiées dans ces cas de trachome appartiennent généralement aux sérotypes A, B, Ba et C; cependant des variants et des recombinants de sérotypes ainsi que des sérotypes d'infections urogénitales (D, E, F, L₂) sont parfois isolés (Brunham *et al.*, 1990; Dean *et al.*, 1992; Hayes *et al.*, 1995; Schachter & Dawson, 1990).

L'ophtalmie du nouveau-né d'origine chlamydienne est aussi rapportée dans certains pays: au Kenya, sa prévalence était de 17 % dont 4 % étaient survenus chez des enfants nés de mères doublement infectées par *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* (Goeman *et al.*, 1991).

3.4 DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE DES INFECTIONS UROGÉNITALES CHLAMYDIENNES

3.4.1 Prélèvements

La qualité du prélèvement conditionne les résultats des examens directs et le site de prélèvement est fonction de la localisation de l'infection. Les échantillons doivent contenir des cellules infectées de l'hôte, mais la nécessité de la viabilité des micro-organismes lors des examens ultérieurs dépend de la technique choisie. En général, seule la culture exige des corps chlamydiens viables.

3.4.1.1 Échantillons destinés à la culture

Les échantillons pouvant être soumis à la culture sont les écouvillonnages endocervicaux chez la femme, urétraux chez les sujets des 2 sexes, ainsi que les aspirations de pus de bubon, des écouvillonnages rectaux ou des pièces biopsiques de lésions rectales recueillies sous anoscopie dans les cas de lymphogranulomatose vénérienne et les écouvillonnages vaginaux chez la jeune fille prépubertaire. Chez la femme, la culture simultanée des prélèvements endocervicaux et urétraux permet d'augmenter de près 25 % les chances d'isoler *C. trachomatis* (CDC, 1993). Les écouvillons utilisés pour les prélèvements ne doivent être ni toxiques pour les cellules, ni inhiber la croissance des *Chlamydia*. Ils peuvent être en dacron, en coton, en rayon ou en alginate de calcium; mais les tiges en bois sont à éviter. Les nouveaux lots d'écouvillons doivent être soumis à des

tests de toxicité avant leur utilisation. L'emploi de brosse cytologique (cytobrush) est traumatisant et provoque souvent des saignements qui peuvent inhiber la croissance des *Chlamydia*. Entre le moment du prélèvement et la culture, les échantillons placés dans le milieu de transport et de conservation peuvent être gardés entre 2 et 8°C si le délai n'exède pas 48 h. Au-delà, ils doivent être gardés à -70°C jusqu'au moment de leur emploi; mais la congélation entraînerait 20 % de perte de viabilité. Ils ne doivent pas être gardés à -20°C (Black, 1997; CDC, 1993).

Les milieux de transport et de conservation qui sont le plus utilisés pour les échantillons destinés à la culture des *C trachomatis* sont le 2-sucrose phosphate (2SP) et le sucrose-glutamate phosphate (SPG). Ceux-ci peuvent être supplémentés avec des inhibiteurs de croissance des micro-organismes contaminants comme la gentamicine (10 µg/mL), la vancomycine (100 µg/mL) et l'amphotéricine B (2,5 à 4 µg/mL). L'addition de 2 à 5 % de sérum fœtal de veau permettrait de réduire la mortalité liée à la congélation. Il existe des milieux commerciaux comme le FlexTrans (Bartels Diagnostics) ou le M4 (MicroTest Inc.): le M4 encore appelé "milieu universel" serait comparable au milieu 2SP et il peut être utilisé aussi pour la collecte d'échantillons destinés à la détection de l'ADN chlamydien (Black, 1997).

3.4.1.2 Échantillons destinés aux méthodes non culturales

Ils comprennent quelques uns des écouvillonnages cités antérieurement et aussi les urines, les liquides articulaires, les échantillons recueillis au niveau de la partie supérieure du tractus génital féminin, notamment pour la détection de l'ADN chlamydien. Pour les tests commerciaux destinés à ces fins, il importe de suivre les prescriptions des manufacturiers pour les prélèvements. Les échantillons urétraux de la femme, rectaux et les écouvillonnages vaginaux de filles prépubertaires ne sont pas habituellement acceptables pour les méthodes non culturales (Black, 1997). Les urines collectées en volume suffisant (10 à 20 mL) dans des contenants propres, doivent être réfrigérées immédiatement entre 2 et 8°C, températures auxquelles ces échantillons peuvent être gardés pendant 4 jours. L'ADN chlamydien est dénaturé dans les urines gardées à la température ambiante (25°C). L'incidence de la congélation des urines sur la qualité des résultats attendus est mal connue à l'heure actuelle. Les ARN sont beaucoup plus sensibles à la dénaturation que les ADN: des précautions conséquentes doivent être prises pour le traitement des échantillons

destinés à leur détection. En général des inhibiteurs de RNase comme le thiocyanate de guanidine sont inclus dans les solutions. Les ARN (ARNr, ARNm) ont l'avantage de prouver la viabilité des micro-organismes, notamment dans les contextes d'infections chlamydiennes persistantes.

Des contrôles réguliers sont nécessaires pour vérifier non seulement la qualité des prélèvements, mais aussi celle des méthodes d'analyses adoptées (Black, 1997).

3.4.2 Diagnostic direct

3.4.2.1 Culture de *C. trachomatis* et étude de sa sensibilité aux antibiotiques

Le remplacement de l'inoculation des échantillons à des œufs embryonnés de poule par la culture cellulaire, a rendu beaucoup moins fastidieuses l'isolement et l'étude de la sensibilité des souches de *C. trachomatis* aux antibiotiques (Ehret & Judson, 1993; Gordon & Quan, 1965; Kuo et al., 1972, 1972a; Ridgway et al., 1976; T'ang et al., 1957). Récemment, les cellules épithéliales polarisées ont également été proposées pour la culture de *C. trachomatis* (Wyrick et al., 1993).

Isolement

Les cellules McCoy et HeLa 229 sont les plus couramment utilisées pour la culture des *C. trachomatis*. Les feuillets cellulaires confluent sont produits dans des tubes contenant des lamelles circulaires en verre ou dans des puits de plaques de 24, 48 ou 96 puits munis de lamelles. Toutefois, les grandes surfaces fournissent les meilleurs résultats (Black, 1997; Ehret & Judson, 1993). La culture des *Chlamydia* consiste à inoculer les échantillons homogénéisés à ces feuillets cellulaires dont la susceptibilité à l'infection peut être augmentée par leur prétraitement avec le DEAE-dextran (Black, 1997; Kuo et al., 1972, 1972a). Le volume de l'échantillon doit être suffisant pour couvrir entièrement le feuillet cellulaire. Après inoculation, les contenants sont centrifugés pendant 1 h, entre 30 et 37°C, à près de $1.500 \times g$ pour les plaques ou entre 2.500 et $3.000 \times g$ pour les tubes. La centrifugation et l'utilisation de DEAE-dextran ne sont pas nécessaires pour l'isolement des souches du biovar LGV (Black, 1997; Ehret & Judson, 1993; Kuo et al., 1972, 1972a). Au terme de la centrifugation, le milieu de suspension de l'inoculum, est éliminé des puits et remplacé par du milieu de culture des *Chlamydia*: le milieu de culture le plus couramment utilisé est composé de EMEM (Eagle's minimal essential medium) supplémenté d'acides

aminés, de vitamines, de 5 à 10% de sérum foetal de veau, de L-glutamine (2 mM) et de glucose. L'addition de bicarbonate de sodium ou de tampon HEPES (10 mM) permet de maintenir le milieu à un pH neutre. L'utilisation de 0,5 à 2 µg/mL de cycloheximide permet d'inhiber la synthèse des macromolécules par les cellules hôtes au profit des corps chlamydiens à cultiver. Enfin, l'addition de gentamicine, vancomycine et amphotéricine B permet d'inhiber la croissance de germes contaminants. Les passages aveugles multiples augmentent les chances d'isoler les *Chlamydia* (Jones et al., 1986).

Après 48 à 72 h d'incubation entre 30 et 35°C ou à 37°C, les inclusions chlamydiennes peuvent être détectées après coloration à l'iode, au Giemsa, au May-Grünwald Giemsa ou mieux, par des Ac fluoromarkés qui reconnaissent le LPS ou la PMME du micro-organisme; mais l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-PMME spécifiques de l'espèce est préférable aux autres méthodes de coloration.

La culture est considérée comme la méthode de référence dans la plupart des laboratoires: sa spécificité avoisine 100 % et sa sensibilité varie entre 70 et 90 % lorsque les mAc spécifiques d'espèce sont utilisés pour visualiser les inclusions chlamydiennes. Par ailleurs, les isolats peuvent être typés à des fins multiples et/ou être soumis à des tests de sensibilité aux antibiotiques. L'identification des sérotypes peut être réalisée grâce à des mAc qui reconnaissent des épitopes spécifiques de sérovars portés par la PMME. Elle peut aussi se faire par le génotypage basé sur l'analyse des gènes *omp-1* des isolats: ces gènes amplifiés par PCR sont ensuite analysés par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou par électrophorèse en gel de gradient dénaturant. L'électrophorèse en champ pulsé permet d'analyser le génome en entier (De Barbeyrac & Bébéar, 1997). Toutefois, la culture est coûteuse en matériel et en temps (3 à 7 jours), et elle requiert une expertise technique de haut niveau (Black, 1997; CDC, 1993; Ehret & Judson, 1993).

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'inoculum est constitué de CE purifiés et arbitrairement, sa taille doit être suffisante pour permettre d'obtenir 10^2 à 10^3 inclusions par lamelles. Cependant, plusieurs laboratoires préfèrent utiliser des inocula de 10^3 à 10^4 unités formant inclusion (ufi) pour inoculer les feuilletts cellulaires de chaque puits: de tels titres sont nécessaires pour détecter la résistance aux antibiotiques (Ehret & Judson, 1993). L'étude de la sensibilité aux antibiotiques se pratique comme pour l'isolement des *Chlamydia*, à la différence que le milieu de culture ne

contient pas d'inhibiteurs de croissance des microbes contaminants, mais plutôt des dilutions sériées de l'antibiotique à tester. La concentration minimale inhibitrice est déterminée au terme du premier passage en milieu de culture avec antibiotique (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) n'est établie qu'après un autre passage en milieu sans antibiotique. Les inclusions chlamydiennes sont détectées au microscope après coloration. La CMI correspond à la plus faible concentration qui inhibe la formation d'inclusion et la CMB est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe complètement la formation d'inclusion après passage en milieu sans antibiotique (Ehret & Judson, 1993).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de technique standard de culture ou d'étude de la sensibilité des *Chlamydia* aux antibiotiques: d'un laboratoire à un autre, des variations existent à toutes les étapes.

3.4.2.2 Méthodes non culturales

Elles comprennent les techniques de détection des antigènes (Ag) et celles des acides nucléiques (ADN, ARN).

Détection des antigènes

Tests d'immunofluorescence directe

Elle repose sur la détection directe des Ag de CE chlamydiens, le LPS ou la PMME, dans les frottis d'écouvillonnages urogénitaux. La spécificité du test dépend de la nature des Ac (monoclonaux ou polyclonaux) utilisés et des Ag à détecter: l'utilisation d'anticorps anti-LPS est beaucoup moins spécifique que celle des Ac anti-PMME. Par rapport à la culture, cette spécificité varie entre 98 et 100 %, et la sensibilité est comprise entre 80 et 90 %. Ces tests d'utilisation très répandue, ont l'avantage d'être rapide avec un temps d'exécution inférieur à 1h. Cependant, leur pratique fait appel à un personnel bien exercé (Black, 1997; CDC, 1993)

Les tests immunoenzymatiques

Les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): sont les plus couramment utilisés. Ils reposent généralement sur la détection du LPS chlamydien par des Ac mono- ou polyclonaux. Cet Ag donne des réactions croisées avec les Ac orientés contre d'autres

micro-organismes. La spécificité de certains tests peut être augmentée par des tests de blocage compétitif qui utilisent des Ac monoclonaux spécifiques du LPS. Dans ces conditions, la spécificité devient supérieure à 99 %, alors qu'elle est voisine de 97 % sans confirmation par blocage. Les temps de réalisation de ces tests varient entre 3 et 4 h. Il existe de nombreux tests commerciaux semi-automatiques comme les tests EIA Chlamydiazyme (Abbott Diagnostic), Microtrak EIA (Behring) et des techniques automatisées comme le Microtrak XL (Behring), VIDAS *Chlamydia* (BioMérieux) (Black, 1997; CDC, 1993).

Les tests rapides: utilisent le principe des tests ELISA, mais ils peuvent être réalisés en 30 mn et la lecture est visuelle et qualitative. Ces tests ont fait l'objet de très peu d'évaluation; mais selon certaines études, leur sensibilité serait comprise entre 52 et 85 % et leur spécificité supérieure à 95 % par rapport à la culture. Leur utilisation est déconseillée chez les sujets asymptomatiques et dans les zones de faibles prévalences d'infections chlamydiennes car ils produisent de nombreux faux-positifs (Black, 1997; CDC, 1993). Des tests commerciaux sont disponibles sur le marché: Clearview (Unipath Ltd), Test Pack (Abbott) et SureCell (Johnson & Johnson). Les résultats fournis par ces tests sont présomptifs et ils sont à confirmer.

Détection des acides nucléiques

Tests d'hybridation avec des sondes d'ADN

Ils peuvent être réalisés sur des ARNr directement fixés sur divers types de support dont les billes magnétiques en milieu liquide (Black, 1997; CDC, 1993), sur des membranes de nylon ou de nitrocellulose (Cheema et al., 1991; Holland et al., 1992), ou encore sur des acides nucléiques in situ (Beutler et al., 1995; Campbell et al., 1993; Cappuccio et al., 1994). La sonde peut être marquée à froid par des substances chémioluminescentes, ou à chaud par des isotopes radioactifs: les ARN-ADN hybrides sont alors détectés par des méthodes qui utilisent leurs réponses luminescentes ou par des méthodes radiologiques. À l'heure actuelle, le seul test commercial reposant sur ce principe est le PACE 2 (Gen-Probe). Ce test utilise une sonde d'ADN chémioluminescente qui s'hybride spécifiquement avec l'ARNr 16S de *C. trachomatis*: le duplex ARN-ADN fixé sur 1 bille magnétique est ensuite détecté par sa luminescence. L'utilisation de sonde compétitive (PCA: Probe Competition Assay) permet de confirmer les résultats faussement positifs. En utilisant la

culture comme méthode de référence dans des zones où la prévalence des chlamydioses génitales est comprise entre 3 et 16 %, la sensibilité du test PACE 2 varie entre 67 et 96% et sa spécificité entre 97 et 100 %. La chaîne de froid n'est pas nécessaire pour la conservation des échantillons et le test est réalisé en 2 à 3 h. Il existe un test mixte PACE 2C qui permet la détection simultanée de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* et dont la sensibilité est > 89 % et la spécificité > 95 % (Black, 1997).

Tests d'amplification des acides nucléiques

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la technique la plus utilisée pour l'amplification des acides nucléiques chlamydiens. L'amplification peut porter sur des séquences de l'ADN chromosomique, de l'ADN plasmidique, des ARNr ou des ARNm. Selon les types d'amorces oligonucléotidiques utilisées, la PCR peut être spécifique du genre, de l'espèce, de la sous-espèce ou de la souche.

Amplification de l'ADN chlamydien: elle augmenterait de 30 % la sensibilité des tests classiques. Deux tests sont disponibles dans le commerce: le test Amplicor (Roche Diagnostic) et le test Ligase chain reaction ou LCR (Abbott) qui détecte tous deux, le plasmide de *C. trachomatis*. Les amplicons du test Amplicor sont détectés par une réaction colorimétrique sur un spectrophotomètre, alors que le test LCR est réalisé sur un thermocycleur et ses amplicons sont détectés par un appareil automatique appelé LCx. Dans des zones de hautes prévalences d'infections chlamydiennes (3 à 18 %), la spécificité et la sensibilité du test Amplicor varient de 92 à 96% et de 98 à 100% et ceux du test LCR varient de 87 à 98 % et de 99 à 100 %, respectivement (Black, 1997).

Il existe aussi des "PCR-maison" pour l'amplification des gènes de l'ADN, notamment de l'*omp-1*.

Amplification des ARN chlamydiens: les techniques utilisées pour la détection des ARNr sont les tests SDA (Strand Displacement Amplification de Becton Dickinson), TMA (Transcription Mediated Amplification de Gen-Probe), Q- β (Q- bêta replicase de Gene-Track) et NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification d'Organon Teknika) ou 3SR (Self Sustained Sequence Replication). Les amplifications se font dans des conditions isothermes, et les amplicons produits sont détectables par des méthodes diverses (Black, 1997; Merel, 1995).

Les techniques disponibles pour l'amplification des ARNm sont des "RT-PCR maison": elles s'adressent à divers types transcrits de gènes dont l' *omp-1* et le *hsp60* (Khan et al., 1996; Munoz et al., 1996).

Les techniques d'amplification des acides nucléiques constituent des outils de recherche hautement sensibles et spécifiques; en plus de leurs utilisations pour le diagnostic des infections chlamydiennes dans lesquelles les échantillons destinés à la culture ou aux tests antigéniques ne sont pas disponibles, ces tests trouvent également des indications dans le contrôle de l'antibiothérapie (Gaydos et al., 1998; Khan et al., 1996; Morre et al., 1998b).

3.4.3 Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect des infections urogénitales chlamydiennes fait essentiellement appel à des tests sérologiques et au test de Leucocyte Estérase (LE). Ce dernier est un test rapide qui utilise des bandelettes réactives pour la détection d'une enzyme leucocytaire produite par les polynucléaires dans les urines au cours des infections du tractus urinaire. Dans ce test, l'inflammation est détectée à travers l'intensité de la coloration pourpre produite par l'hydrolyse de l'ester d'idoxycarbonate par la LE. Les infections pouvant être dues à une diversité de bactéries dont le gonocoque, le test de LE n'est pas spécifique (Black, 1997).

Les principaux tests sérologiques destinés à la détection des Ac dans les infections chlamydiennes sont la microimmunofluorescence (MIF), les tests immunoenzymatiques et le test de fixation du complément (FC) (Black, 1997; CDC, 1993; Darougar, 1985). Les titres élevés d'anticorps sont fréquents chez les femmes ayant des résultats positifs pour la culture et chez celles ayant des cultures négatives, mais qui sont partenaires d'homme souffrant d'urétrite chlamydienne. Les IgM signent des infections actives, alors que les IgG traduisent des infections anciennes ou récurrentes. Parfois, l'analyse de 2 sérums distincts recueillis à 15 j d'intervalle est nécessaire pour confirmer le résultat d'un test (Black, 1997; Darougar, 1985). La cinétique des Ac lors des infections humaines n'est pas bien connue, celles-ci étant silencieuses dans la grande majorité des cas.

3.4.3.1 Le test de FC

Ce test détecte les Ac fixant le complément qui reconnaissent l'antigène lipopolysaccharidique (LPS) spécifique du genre *Chlamydia*. Dans les infections à *C. trachomatis*, il est surtout utilisé dans le diagnostic sérologique de la LGV: la LGV est une maladie systémique qui entraîne une réponse sérologique souvent plus importante que celle induite par les souches du biovar trachoma (Black, 1997; Darougar, 1985). Un titre d'anticorps ≥ 256 est fortement en faveur d'une LGV, alors que des titres ≤ 32 indiquent des tests négatifs. Un titre ≥ 64 peut être associé à une infection par un sérotype du biovar trachoma (Black, 1997).

3.4.3.2. Le test de MIF

Le test de MIF est le plus sensible des tests sérologiques des infections chlamydiennes. Il utilise la PMME comme source antigénique et il a l'avantage de détecter des Ac de types IgM et IgG spécifiques du genre, de l'espèce et du sérotype (Black, 1997; CDC, 1993; Darougar, 1985). Cependant, sa réalisation laborieuse limite son utilisation à quelques laboratoires de recherche. L'utilisation de sérums positif et négatif de références permet de déterminer les normes de positivité des réponses sérologiques (Black, 1997).

3.4.3.3 Les tests immunoenzymatiques

Tests ELISA

Ces tests utilisent le LPS ou des lysats de CE et/ou de CR chlamydiens entiers comme sources antigéniques: ils détectent des Ac spécifiques du genre *Chlamydia*. Ceux qui détectent les IgM dans les pneumonies infantiles chlamydiennes seraient aussi sensibles que le test de MIF. Plusieurs tests ELISA de détection des Ac anti-*Chlamydia* sont disponibles dans le commerce (Black, 1997).

Autres tests immunoenzymatiques

Les tests ImmunoComb[®] (Organics, Israël) utilisent le LPS extrait de *C. trachomatis* L₂ et le test ImmunoComb *Chlamydia* bivalent[®] du même manufacturier, utilise les LPS extraits de *C. trachomatis* L₂ et de *C. pneumoniae*. Ces Ag sont fixés sur des peignes qui se trempent dans le sérum et les différentes solutions de réactifs au cours du test.

Le test Ipazyme (Savyon, Israël) utilise le LPS et des extraits de CR comme Ag.

Il existe très peu de données sur l'utilisation clinique de ces trois tests (Clad et *al.*, 1993; 1994). Par ailleurs, plusieurs autres tests ELISA "maison" et commerciaux sont largement utilisés pour la détection des Ac sériques dans des infections urogénitales chlamydiennes.

L'immunoblot trouve aussi des applications dans le diagnostic sérologique des infections chlamydiennes (Newhall et *al.*, 1982); toutefois aucun test commercial n'est disponible actuellement.

Les tests sérologiques trouvent d'importantes applications dans le diagnostic des complications d'infections urogénitales chlamydiennes, bien que leur utilisation dans la confirmation du diagnostic soit encore controversée pour certains auteurs (Black, 1997; Chernesky et *al.*, 1998; Numazaki, 1998). La culture restera indispensable non seulement pour des contrôles de qualité, mais aussi pour l'isolement des souches à caractériser ainsi que pour la production des Ag destinés à divers tests. Cependant, de tous les tests utilisés dans le diagnostic des infections chlamydiennes, ceux destinés à la détection des acides nucléiques sont assurément les plus prometteurs.

3.5 TRAITEMENT DES INFECTIONS GÉNITALES CHLAMYDIENNES

3.5.1 Traitement curatif

Les tétracyclines, les macrolides et plus récemment certaines fluoroquinolones, sont les antibiotiques de choix pour le traitement des infections chlamydiennes (CDC, 1991, 1993, 1998; Ehret & Judson, 1993; Jones, 1991; Ridgway, 1997; Sanders et *al.*, 1986). Tels qu'ils apparaissent dans le Tableau VI, les schémas thérapeutiques varient selon les terrains et les manifestations cliniques.

3.5.1.1 Infections urogénitales non compliquées

Ce sont les urétrites, les endocervicites et les rectites des adultes. Les antibiotiques de premiers choix sont surtout la doxycycline, la Tétracycline et l'azithromycine (CDC, 1993, 1998; Ridgway, 1997; Sanders, et *al.*, 1986; Weber & Johnson, 1995); cependant, la doxycycline est préférée à la Tétracycline hydrochloride car elle nécessite moins de prises quotidiennes. L'oxytétracycline et la minocycline sont aussi utilisées dans le traitement des MST chlamydiennes non compliquées (Mardh et Löwing, 1990). Les taux de pénétration et les concentrations cellulaires très élevés de l'azithromycine, ainsi que son temps de demi-

Tableau VI: Exemples de schémas thérapeutiques pour les traitements d'infections chlamydiennes (CDC, 1993, 1998; Jones, 1991; Mardh & Löwing, 1990; Ridgway, 1997)

Infections urogénitales et terrains/ Antibiotiques	Posologies
1. Infections non compliquées (urétrites, endocervicites, rectite de l'adulte)	
<i>1er choix:</i> - Doxycycline	100 mg × 2 / j × 7j , po
ou - Tétracycline	500 mg × 4 / j × 7j, po
ou - Azithromycine	1g en dose unique, po
<i>Alternative:</i> - Érythromycine base	500 mg × 4 / j × 7 j, po
ou - Érythromycine éthylsuccinate	800 mg × 4 / j × 7 j, po
ou - Ofloxacin	300 mg × 2 / j × 7 j, po
2. Infections urogénitales de la femme enceinte	
<i>1er choix:</i> - Érythromycine base	500 mg × 4 / j × 7 j, po
<i>Alternative:</i> - Érythromycine base	250 mg × 4 / j × 14 j, po
ou - Érythromycine éthylsuccinate	800 mg × 4 / j × 7 j, po
ou - Érythromycine éthylsuccinate	400 mg × 4 / j × 14 j, po
3. Lymphogranulomatose vénérienne	
<i>1er choix:</i> - Doxycycline	100 mg × 1 / j × 21 j , po
<i>Alternatives:</i> - Doxycycline	100 mg × 2 / j × 14 j, po
ou - Tétracycline hydrochloride	500 mg × 4 / j × 4 semaines, po
ou - Érythromycine base	500 mg × 4 / j × 21 j, po

j: jour; po: per os

vie prolongé, favorisent son utilisation en dose unique dans le traitement des MST chlamydiennes non compliquées (Jones, 1991; Stamm, 1991). D'autres nouvelles macrolides comme la roxithromycine et la clarithromycine constituent des alternatives thérapeutiques, notamment chez la femme enceinte (Ridgway, 1997). Les fluoroquinolones sont des chlamydiacides: parmi elles, la ciprofloxacine pourtant très active *in vitro*, s'est montrée cliniquement inefficace. L'ofloxacine s'est révélée hautement active dans plusieurs essais cliniques: elle est diversement utilisée à des doses de 300 à 400 mg, 1 ou 2 fois par jour, pendant 7 jours. De même, l'utilisation de la sparfloxacine à des posologies variées a permis d'obtenir une cure bactériologique et clinique de MST chlamydiennes. D'autres fluoroquinolones comme la trovafloxacine et la fluoro naphthyridone sont très actives contre *C. trachomatis in vitro* (Ridgway, 1997). L'ofloxacine n'est pas recommandée chez les adolescents de moins de 17 ans et chez les femmes enceintes. L'utilisation des β -lactamines seules comme alternative thérapeutique, notamment chez les femmes enceintes est controversée (Ridgway, 1997).

3.5.1.2 Infections urogénitales compliquées

Dans les PID

Elles peuvent être dues aux endométrites, salpingites, abcès tubo-ovariens,... L'antibiothérapie doit tenir compte du caractère polymicrobien des infections: *Chlamydia trachomatis* est souvent associée à d'autres agents pathogènes comme *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, les streptocoques, les coliformes et les bactéries anaérobies non sporulantes. Le traitement doit reposer sur une association d'antibiotiques actifs sur tous ces pathogènes (CDC, 1991, 1998; Ridgway, 1997). Chez les patientes hospitalisées, le traitement associe une céphalosporine (cefoxitine, cefotetan) ou une pénicilline (amoxicilline-acide clavulanique) administrée pendant 2 j et d'une tétracycline (doxycycline) ou d'une fluoroquinolone (ofloxacine) pendant 10 à 14 j après la sortie de l'hôpital (CDC, 1991, 1998; De Barbeyrac & Bébéar, 1997). Selon le CDC (1991), le traitement peut aussi combiner la clindamycine et la gentamicine administrées par voie parentérale pendant 48 h sur le lit d'hôpital, suivies de doxycycline ou de clindamycine pendant 10 à 14 j à la sortie de l'hôpital. Le métronidazole (500 mg, toutes les 8 h, pendant 48 h) est parfois utilisé par voie IV au cours de l'hospitalisation. Chez les patientes non hospitalisées, le CDC (1991, 1998) recommande d'associer une céphalosporine (telle que la

cefotixime ou la ceftriaxone) en IM + la probenecide par voie orale et la doxycycline, la Tétracycline hydrochloride ou l'érythromycine base administrée pendant 10 à 14 j.

Dans les épидidymites et le syndrome de Fitz-Hugh-Curtis

Le traitement repose sur des traitements de 10 à 21 j à base de tétracyclines (doxycycline ou minocycline, 100 mg \times 2/j), l'érythromycine (500 mg \times 4/j) ou d'ofloxacine (400 mg/j) (De Barbeyrac & Bébéar, 1997).

Le syndrome Fiessenger-Leroy-Reiter

Il est traité avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (De Barbeyrac & Bébéar, 1997).

Infections génitales chlamydiennes chez l'enfant

Elles surviennent essentiellement lors des abus sexuels et des naissances de mères dont l'endocol est colonisé par *C. trachomatis*. L'antibiothérapie repose sur l'utilisation d'érythromycine ou d'azithromycine. Lorsque l'âge le permet, la doxycycline peut être utilisée par voie orale à 100 mg \times 2/j pendant 7 j (CDC, 1991, 1998).

Les échecs thérapeutiques

En général, les antichlamydiens sont administrés aux patients à des prises quotidiennes multiples, pour des durées de 7 à 21 j, voire 1 mois. Par ailleurs, les tétracyclines et certains macrolides ont des effets indésirables qui incommode les patients et les poussent à interrompre leur traitement: il en résulte des échecs thérapeutiques.

Les taux d'échecs de traitement par la tétracycline hydrochloride, la doxycycline ou la minocycline pendant 7 à 21 j sont compris entre 0 et 3 % pour les urétrites masculines et entre 0 et 8 % pour les cervicites; certains auteurs ont rapporté des taux d'échec de 27 % avec la doxycycline dans le traitement des cervicites. Avec l'érythromycine administrée pendant 7 à 14 j, les taux d'échecs chez les patients masculins varient entre 0 et 37% et chez les femmes non enceintes, ils sont compris entre 0 et 34 % (Ehret & Judson, 1993; Toomey & Barnes, 1990). Les conséquences des échecs thérapeutiques peuvent être le développement de complications aux séquelles redoutables et la transmission de l'infection à des partenaires sexuels et/ou aux nouveaux-nés. Toutefois, la découverte de nouvelles molécules comme l'azithromycine ou la mise au point de nouvelles formulations d'antibiotiques peuvent permettre de pallier à certains de ces inconvénients.

3.5.2 Prévention

Les mesures générales de prévention des infections urogénitales chlamydiennes sont celles des autres MST. Elles comprennent notamment l'utilisation de préservatifs, l'information et l'éducation des sujets exposés ou à risques, le traitement systématique des partenaires de personnes infectées, etc...

À l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre les MST chlamydiennes. Plusieurs composantes de corps chlamydiens sont des candidats potentiels pour la vaccination (Bavoil et *al.*, 1996); parmi elles, certaines ont fait l'objet d'études (Su et *al.*, 1998; Ward, 1992), mais aucune d'entre elles n'a donné des résultats concluants chez l'homme.

3.6 CONCLUSION

Les infections chlamydiennes constituent l'une des pathologies infectieuses humaines les plus anciennes. De nombreux progrès ont été réalisés depuis que l'isolement du micro-organisme a été rendu possible, notamment en culture cellulaire. Avec l'avènement de techniques de biologie moléculaire permettant d'effectuer des analyses plus fines de la structure des corps chlamydiens et de la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection chlamydienne, il devient possible d'élucider de nombreux points restés jusqu'alors obscurs de la biologie du pathogène: la caractérisation du génome de *C. trachomatis* a révélé l'existence de plusieurs centaines de gènes codants potentiels de protéines dont les structures et les fonctions ne sont pas encore connues. Ces données ouvrent de nouveaux horizons dans la "chlamydiologie". C'est aussi dans ce sens que les recherches sur la vaccination restent un des champs majeurs d'investigation sur les infections chlamydiennes qui constituent des problèmes de santé publique dans le monde et dont les incidences socio-économiques sont énormes.

BUT DU PROJET

La problématique des infections génitales à *Chlamydia trachomatis*, tient essentiellement à leur évolution à bas bruit avec les difficultés diagnostiques qui en résultent, l'irrégularité des corrélations entre données microbiologiques et manifestations cliniques, et l'échec de l'antibiothérapie particulièrement à des stades très avancés de l'infection.

C. trachomatis est un pathogène intracellulaire absolu: aussi, les antibiotiques utilisés doivent non seulement traverser les membranes de la cellule hôte, pénétrer dans les inclusions et atteindre leurs cibles dans les corps chlamydiens, mais ils doivent également s'y maintenir à des concentrations bactéricides pendant un temps approprié. Ces caractéristiques sont requises pour une meilleure efficacité thérapeutique. Diverses stratégies ont été développées pour répondre à ces attentes, notamment la mise au point de nouvelles molécules (Kirst, 1991) ou de système de transport et de protection des drogues, peu ou pas toxique comme les liposomes (Couvreur et al., 1977; Lopez-Berestein, 1987).

Les liposomes sont de bons vecteurs colloïdaux d'antimicrobiens qui ont été expérimentés contre des agents intracellulaires parasitaires, fongiques, bactériens (Lopez-Berestein, 1987) et viraux (Phillips, Skamene & Tsoukas, 1991): ils ont permis de réduire la toxicité et les doses des drogues, de les protéger contre certains facteurs d'inactivation, de faciliter leur transport vers les site d'action intracellulaires, d'accroître leur pénétration tissulaire et d'y prolonger leurs activités antimicrobiennes (Marchal-Heussler et al., 1990; Ravaoarino & Toma, 1993). À ce jour, une seule étude connue a été réalisée sur l'encapsulation de macrolides dans les liposomes (Stuhne-Sekalec, Stanacev & Djokic, 1991), de même qu'une seule étude connue existe sur l'utilisation d'antibiotique, la tétracycline en l'occurrence, encapsulé contre *C. trachomatis* en culture sur une lignée fibroblastique de souris (Al-Awadhi, Stokes & Reich, 1992). Des techniques d'encapsulation des antibiotiques dans des liposomes ont déjà été développées par Ravaoarino et al. (1993) et leur efficacité contre certains agents bactériens a été évaluée *in vitro* (Omri et al., 1995). Aucune étude n'a été faite sur l'activité *in vivo* d'un antibiotique liposomal sur les *Chlamydia*. Cependant, celle-ci se justifie par la fréquence des échecs thérapeutiques connus, particulièrement dans les infections génitales dont ces germes sont responsables. La souris constitue un modèle de choix pour l'étude expérimentale *in vivo*, des infections chlamydiennes (Hildebrandt, 1986): elle a permis de reproduire les infections

aiguës et des complications génitales semblables à celles observées chez la femme. Ce modèle animal a été utilisé également pour certains essais thérapeutiques (Hildebradt, 1986; Rank, 1994).

Le but principal du présent projet est de développer un modèle murin d'infection génitale chlamydienne chez la femme et d'évaluer dans ce système expérimental, l'efficacité d'un antichlamydien encapsulé dans les liposomes en comparaison avec sa forme libre.

Pour cela, nous encapsulerons des cyclines et des macrolides dans des liposomes cationiques, anioniques et neutres et nous évaluerons leur stabilité dans le sérum humain normal et leurs toxicités sur des cellules humaines *in vitro*. Nous démontrerons l'augmentation des activités antichlamydiennes des antibiotiques liposomaux *in vitro*, par rapport à leurs formes libres. Par ailleurs nous développerons un système expérimental d'infection génitale chlamydienne produisant des lésions tissulaires semblables à celles rencontrées chez les humains, tant au niveau de la partie inférieure qu'au niveau de la partie supérieure du tractus génital féminin. Les animaux infectés seront ensuite traités avec la forme libre ou la formulation liposomale de l'antibiotique qui présentera les meilleures caractéristiques sur la base du capital de données accumulées lors des expériences réalisées *in vitro*. Nous déterminerons les paramètres microbiologiques et nous caractériserons les lésions tissulaires chez les souris aux cours de l'infection et du suivi du traitement. Les résultats qui seront obtenus *in vivo* nous permettront de vérifier les avantages liés à l'utilisation de formulation liposomale dans le traitement des infections génitales chlamydiennes chez la femme. À ce jour, aucune étude ne fait état de l'utilisation d'un antibiotique liposomal dans le traitement des infections chlamydiennes dans un système expérimental animal. Nos résultats serviront de base pour l'évaluation des activités d'autres antichlamydiens usuels et pour la mise au point de stratégie d'antibiothérapie des infections chlamydiennes.

L'originalité de notre projet de recherche se situe à 3 niveaux. D'une part notre travail fournit les premières données sur l'encapsulation de la doxycycline dans les liposomes. D'autre part, nous développons un nouveau système expérimental d'infection génitale chlamydienne pour lequel nos descriptions des lésions histopathologiques des parties supérieures du tractus génital sont les premières à être rapportées dans la littérature. Enfin,

nous fournissons des données sur le potentiel d'une tétracycline liposomale dans le traitement des infections chlamydiennes.

Ces différents aspects soulignés dans notre étude apportent une importante contribution sur l'utilisation potentielle des formulations liposomales des antibiotiques dans le traitement des chlamydioses génitales qui du reste, sont la plus importante des maladies sexuellement transmissibles d'étiologie bactérienne dans le monde.

DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

CHAPITRE 3: ARTICLE 1

Incorporation rates, stabilities, cytotoxicities and release of liposomal tetracycline and doxycycline in human serum

L. Sangaré, B.Pharm., **R. Morisset**, M.D, M.Sc.,
A. Omri, B. Pharm., Ph. D., **M. Ravaoarino***, Ph.D.

Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

Department of Microbiology and Infectiology, Hôtel-Dieu Campus, CHUM,
3840 St. Urbain Street, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

*Corresponding author. Tel: +1 (514) 843-2675; Fax: +1 (514) 843-2625

Publié dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1998) **42**, 831-834.

Summary

Tetracycline and doxycycline were encapsulated in cationic, anionic and neutral liposomes. The amounts of antibiotic encapsulated, the stability of each preparation at 4°C for 4 weeks, and entrapped drug release kinetics in human sera were assessed by high-performance liquid chromatography. The toxicities of the liposome preparations on human erythrocytes and HeLa 229 cells were evaluated *in vitro*. The results showed that doxycycline was entrapped more efficiently than tetracycline, and that doxycycline-entrapped liposomes were more stable at 4°C and in human sera, and less cytotoxic than tetracycline-entrapped liposomes.

Introduction

Tetracycline and doxycycline are commonly used against many intracellular and extracellular pathogens. However, their administration can result in several adverse effects.¹ When given as therapy for 7 to 10 days or more, they can meet with poor compliance: this is common in many patients with asymptomatic genital infections,¹ frequently resulting in low recovery rates. Despite the broad-spectrum antibacterial activity of the tetracyclines, the resistance of many bacterial groups to tetracyclines has become a public health problem worldwide.² To overcome these obstacles, new molecules such as the glycylicyclines are being developed,² and existing drug formulations are being improved by encapsulating them in liposomes; the characteristics of liposome-entrapped drugs have been well-documented in some microbial infections.³

In this study, we evaluated the efficiency of tetracycline and doxycycline incorporation into charged and neutral liposomes. The stability of these liposome preparations at 4°C, the kinetics of the release of entrapped antibiotics into human serum, and liposome cytotoxicities were assessed *in vitro*.

Materials and methods

Materials

Doxycycline (Pfizer Canada Inc., Kirkland, QC, Canada) and tetracycline (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) stock solutions prepared to final concentrations of 2 mg/mL were stored at -75°C in aliquots until their use. Phospholipids were obtained from Avanti

Polar Lipids Inc. (Birmingham, AL, USA) as cationic (egg lecithin, stearylamine and cholesterol) and anionic liposomes (egg lecithin, dicetylphosphate and cholesterol) with a 7:2:1 molar ratio in each case. Neutral liposome phospholipids were egg lecithin and cholesterol with a molar ratio of 7:1.

Erythrocytes and serum samples were collected from healthy volunteers and tested for the absence of antimicrobial activities before being pooled and frozen at -75°C until their use. Erythrocyte suspensions were prepared as described previously by Parnham & Wetzig.⁴

Preparation of liposomes and entrapped drug determination

Liposomes were prepared by sonication as described previously,⁵ using 2 mg of tetracycline or doxycycline; empty liposomes contained only sterile distilled water. The encapsulation efficiencies of antibiotics were quantitated by high-performance liquid chromatography (HPLC) as outlined elsewhere:⁶ 250 μL of each sample were injected twice onto the columns at a flow rate of 0.9 mL/min. To evaluate liposome stability in preservation at 4°C , the antibiotics were quantitated every week for 4 weeks. All assays were performed in duplicate.

Determination of encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency of each antibiotic into each type of liposome was calculated as a percentage of its initial quantity used to prepare the liposome considered.

Kinetics of release of encapsulated antibiotics into serum

Nine volumes of normal human sera were mixed with one volume of encapsulated antibiotic preparation, then incubated at 37°C .⁵ After various incubation times ranging from 0 h (t_0) to 72 h (t_{72}), 0.5-mL samples of the mixtures were treated as described previously⁷ for HPLC.⁶ The amount of antibiotic released from liposomes in serum was calculated as a percentage of liposomal antibiotic added to serum at the initial time.

Cytotoxicity of liposome preparations

Haemolysis assays were run as described previously:⁵ each liposome preparation was diluted to 50, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the mixtures were incubated for 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 min, prior to spectrophotometric determination. To evaluate liposome

cytotoxicity to HeLa 229 cells, different lipid amounts (0.009 to 5.0 $\mu\text{moles/mL}$) of each liposome preparation were added to 4×10^5 HeLa 229 cells/well in final volumes of 1 mL of culture medium and grown in a 24-well plate, at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 24, 48 and 72 h. Viability of the cells before and after incubation with liposomes was tested by the trypan blue exclusion test.⁴ Each sample test was run in duplicate.

Results

The results are the geometric means \pm S.E.M of independent experiments. Comparisons were made using a paired Student's *t*-test: $P \leq 0.05$ was considered significant.

Encapsulation efficiencies and stability of liposome preparations at 4°C

The entrapment efficiencies of doxycycline were $28.68 \pm 6.41\%$, $49.17 \pm 6.75\%$ and $21.06 \pm 0.84\%$ in cationic, anionic and neutral liposomes respectively, while they were $3.53 \pm 0.38\%$ and $2.23 \pm 0.66\%$ for tetracycline in anionic and neutral liposomes respectively. No tetracycline was detected in cationic liposomes. Doxycycline was encapsulated more than tetracycline in all liposomes ($P \leq 0.02$). The amount of tetracycline in anionic liposomes, stable for the first 2 weeks, and decreased to $1.64 \pm 0.66\%$ from the third to the last week; in its neutral preparation it was stable before decreasing to 1.19% in the last week. Unlike tetracycline entrapped in liposomes, all liposomal doxycycline was very stable during the 4 week study period: the amounts detected from the first to the fourth week ranged from $28.68 \pm 6.41\%$ to 22.27% in cationic, $49.17 \pm 6.75\%$ to 48.73% in anionic, and $21.06 \pm 0.84\%$ to 16.87% in neutral liposomes.

Kinetics of release of encapsulated antibiotics into serum

The Figure presents the in-vitro release kinetics of doxycycline and tetracycline from different types of liposome preparations in normal human sera at 37°C. The results showed better stability of cationic doxycycline- and neutral tetracycline-encapsulated liposomes in human sera than with the other preparations.

Cytotoxicity of liposome preparations to human erythrocytes and HeLa 229 cells

For all amounts of lipids in the liposome preparations analysed, no significant haemolysis was observed with "empty" liposomes: haemolytic activities were ≤ 1.2 % for empty cationic and ≤ 2.4 % for empty anionic liposomes. However, higher values (13%) were obtained for empty neutral liposomes with 500 μg at 100 min. All amounts of lipids in cationic doxycycline-, anionic tetracycline- and neutral tetracycline-encapsulated liposomes lacked haemolytic activity. The highest haemolytic activities were obtained with neutral liposomal doxycycline which gave up to 59.1 % for 500 μg of lipids. Liposome toxicities to HeLa 229 cells were compared using their minimum cytotoxic amount and maximum amount tolerated by these cells in culture for different incubation times. The Table presents the results for all liposome preparations. Anionic preparations were the most toxic of all liposomal doxycycline preparations. Neutral doxycycline-encapsulated liposomes showed the lowest toxicity to HeLa 229 cells in culture.

Discussion

In our study, tetracycline was entrapped in different liposomes much less efficiently than doxycycline. Employing other lipidic constituents, Al-Awadhi *et al.*⁸ found very low encapsulation efficiencies with tetracycline: 1.7 %, 1.3 % and 2.1 % in cationic, anionic and neutral liposomes. Despite the determination methods used and differences in liposome composition, the relative entrapment efficiencies of tetracycline were low in both studies. Stability at 4°C for 4 weeks was good for doxycycline liposomes, but not for tetracycline liposomes. The decrease in encapsulation efficiency of tetracycline in liposomes may have occurred after a break in lipid vesicles. The results obtained showed that cationic and neutral doxycycline-encapsulated liposomes were more stable in human sera than were the other preparations.

The high absorption values of neutral liposomes determined by spectrophotometry, indicated that they had high haemolytic activity. However, we found a similar absorption pattern with neutral liposomes not mixed with erythrocytes, and despite these values, no apparent haemolysis was detected in the samples. Thus, we concluded that neutral liposomes were not toxic to human erythrocytes. Instead of L1210 mouse leukemia cells used by Parnham & Wetzig,⁴ we used HeLa 229 cells to evaluate liposome toxicities to

cells in culture. Neutral doxycycline-encapsulated liposomes showed the lowest cytotoxicity, and anionic preparations were the greatest.

To the best of our knowledge, the present study is only the second devoted to tetracycline encapsulation into liposomes and the first for doxycycline. Our results demonstrated that doxycycline was encapsulated more efficiently than of tetracycline in all types of liposomes. Liposomal doxycycline preparations exhibited good stability when kept at 4°C and in human sera. Cationic and neutral liposomal doxycycline were not cytotoxic *in vitro*. These drug formulations could be used efficiently to carry doxycycline to infected tissues. Extension of drug retention in this condition could not only reduce its dosage, but also allow clinical and bacterial cure of infections caused by sensitive intracellular pathogens and thereby avoid recurrences.

Acknowledgements

This work was supported in part by "Programme Canadien de Bourses de la Francophonie" (PCBF) and in part by a grant from MRC/PMAC (Pfizer Canada Inc.). L.S is the recipient of a PCBF scholarship.

This paper was presented in part at the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1997 in Miami, Florida, USA (Abstract A-148, p. 26).

References

1. Klein, N.C. & Cunha, B.A. (1995). Tetracyclines. *Medical Clinics of North America* **79**, 789-801.
2. Tally, F.T., Ellestad, G.A. & Testa, R.T. (1995). Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**, 449-52.
3. Lopez-Berestein, G. (1987). Liposomes as carriers of antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 675-8.
4. Parnham, M.J. & Wetzig, H. (1993). Toxicity screening of liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **64**, 263-74.
5. Omri, A., Ravaoarinoro, M. & Poisson, M. (1995). Incorporation, release and in-vitro antibacterial activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **6**, 631-9.

6. Tsuji, K. & Robertson, J.H. (1976). Analysis of tetracycline in pharmaceutical preparations by improved high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **65**, 400-4.
7. Hermansson, J. (1982). Rapid determination of tetracycline and lumecycline in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **232**, 385-93.
8. Al-Awadhi, H., Stokes, G.V. & Reich, M. (1992). Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in mouse fibroblasts by liposome-encapsulated tetracycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **30**, 303-11.

Table and figure legends

Table : Cytotoxicity of liposome preparations.

Figure : Encapsulated tetracycline and doxycycline release kinetics in serum.

Table : Cytotoxicity of liposome preparations

Liposome preparations	Quantity of lipid (μM)	Time course of HeLa 229 cell viability (%)		
		24 h	48 h	72 h
Empty cationic liposomes				
-min tox ^a	1.2	95.9	97.4	55.7
-max tol ^b	0.6	96.5	96.5	94.1
Empty anionic liposomes				
-min tox	1.2	78.4	30.0	30.8
-max tol	0.6	96.0	98.0	97.0
Empty neutral liposomes				
-min tox	2.5	96.0	92.4	60.2
-max tol	1.2	96.0	95.0	95.0
Anionic liposomal tetracycline				
-min tox	0.6	96.0	12.2	36.8
-max tol	0.3	96.0	95.3	97.0
Neutral liposomal tetracycline				
-min tox	0.6	96.0	83.3	89.8
-max tol	0.3	96.0	95.0	97.0
Cationic liposomal doxycycline				
-min tox	1.2	88.5	88.4	30.5
-max tol	0.6	91.0	91.2	90.4
Anionic liposomal doxycycline				
-min tox	0.15	95.0	92.6	75.0
-max tol	0.07	95.0	92.6	93.0
Neutral liposomal doxycycline				
-min tox	1.2	92.0	93.0	67.0
-max tol	0.6	92.0	93.0	91.7

^a: minimum cytotoxic amount; ^b: maximum amount of lipids tolerated by cells. These results are the means of two or three independent experiments.

Figure: _____ (Article 1) _____

CHAPITRE 4, ARTICLE 2:

In Vitro Antichlamydial Activities of Free and Liposomal Tetracycline and Doxycycline

L. SANGARE, R. MORISSET and M. RAVAOARINORO*

Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

Department of Microbiology and Infectiology, Hôtel-Dieu Campus, CHUM,
3840 St. Urbain Street, Montreal, QC H2W 1T8, Canada

*Reprint requests: Madeleine Ravaoarino, PhD, Department of Microbiology and
Infectiology, Hôtel-Dieu Campus, CHUM, 3840 St. Urbain Street,
Montreal, QC H2W 1T8, Canada.

Tel: +1 (514) 843-2675; Fax: +1 (514) 843-2625

Publié dans *Journal of Medical Microbiology* (1999) **48**, 689-693.

Summary

The purpose of this study was to evaluate the antichlamydial activities *in vitro* of liposome-encapsulated doxycycline (Dox) and tetracycline (Tet) in comparison with free Dox and Tet. Dox and Tet encapsulated in cationic (CAL), anionic (ANL) and neutral (NTL) liposomes by sonication, were quantitated by high-performance liquid chromatography. Antichlamydial activities were determined by adding serially-diluted antibiotics (MIC: 0.12 to 0.007 $\mu\text{g/ml}$; MBC: 4 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$) on HeLa 229 cell monolayers inoculated with *Chlamydia trachomatis* L₂/434/Bu (10^3 ifu/well). After 72 h incubation at 37°C, chlamydial inclusions were stained by the May-Grünwald Giemsa method to establish MICs. MBCs were determined in chlamydial agent-free medium after second passages. Dox-encapsulation efficiencies were $28.68 \pm 6.41\%$ in cationic (CAL-Dox), $49.17 \pm 6.75\%$ in anionic (ANL-Dox) and $21.06 \pm 0.84\%$ in neutral (NTL-Dox) liposomes. Tet-encapsulation efficiencies were $3.53 \pm 0.38\%$ in anionic (ANL-Tet) and $2.23 \pm 0.66\%$ in neutral (NTL-Tet); no Tet was detected in cationic (CAL-Tet) liposomes. MIC values were 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for Dox, 0.12 $\mu\text{g/ml}$ for Tet, 0.03 $\mu\text{g/ml}$ for CAL-Dox, NTL-Dox and NTL-Tet, and 0.01 $\mu\text{g/ml}$ for ANL-Dox and ANL-Tet. MBCs were 4 $\mu\text{g/ml}$ for Tet, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for CAL-Dox and NTL-Dox, and 1 $\mu\text{g/ml}$ for Dox, ANL-Dox, ANL-Tet, NTL-Tet, and NTL-Tet. For MICs, the relative increase in antichlamydial activities were ranged from 2- to 6-fold and from 4- to 10-fold with liposomal Dox and Tet respectively. For MBCs, values were 1- or 2- and 4-fold with liposome-encapsulated Dox and Tet respectively. Dox was better encapsulated than Tet in all liposomes ($p \leq 0.02$). Liposome-encapsulated drugs showed enhanced antichlamydial activities in comparison with their free forms: thus, these drug formulations have potential in the treatment of chlamydial infections.

Introduction

Chlamydia trachomatis is an obligate intracellular bacterium responsible for a broad spectrum of diseases in humans. It is one of the most common sexually-transmitted pathogens worldwide and can cause major sequelae in men and women (1-3). Currently, tetracyclines and macrolides are the drugs of choice against chlamydial infections, but their multidose use often renders patients non-compliant, and therapy may fail (4-6). Persistent chlamydial infections are known to occur *in vitro* (7, 8). Several cases of recurrent, latent or

persistent infections have been reported even in compliant patients with treatment regimens that appear to be effective; some of them were again infected with the same serovar of *C. trachomatis*, suggesting that the initial infections had not been cured (9). Moreover, a few cases of chlamydial resistance to these drugs have been found *in vitro* (10-12), but the resistance mechanism remains unknown.

Therefore, it appears necessary to find dosage forms that are effective against both acute and chronic chlamydial disease and that can be given for a shorter course. Various strategies have been elaborated to overcome some of these problems: development of new molecules such as azithromycin, a new macrolide (13, 14) and glycylicyclines, new tetracyclines (15) with enhanced antimicrobial spectra and pharmacokinetics. Another way consists of improving drug formulations by using carriers such as liposomes (16). To the best of our knowledge, only 2 studies have been reported in the literature about the encapsulation of antichlamydial drugs into liposomes: erythromycin and azithromycin were encapsulated efficiently in liposomes by Stuhne-Sekalec, Stanacev and Djokic (17) but no microbiological assay was undertaken with these forms. Tetracycline (Tet) was encapsulated in cationic, anionic and neutral liposomes by Al-Awadhi, Stokes and Reich (18), but less efficiently than azithromycin and erythromycin. In the latter study, antichlamydial activities were assessed *in vitro*, using *C. trachomatis* serovar L₂ as the test microorganism, and the pathogen was more sensitive to the liposomal drug than its free form. Hence, drugs encapsulated in liposomes could respond to this need.

Here, we report doxycycline (Dox)- and tetracycline (Tet)-encapsulation efficiencies determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with their antichlamydial activities *in vitro*, targeting *C. trachomatis* serovar L₂ /434/Bu as the test microorganism.

Materials and methods

Chemicals

The antibiotics used were Tet (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and Dox hydrochloride (Pfizer, New York, NY, USA). The phospholipids were obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, USA): cationic liposomes (CAL) consisted of egg lecithin, stearylamine and cholesterol whereas anionic liposomes (ANL) consisted of egg lecithin, dicetylphosphate and cholesterol with a 7:2:1 molar ratio in each case. Neutral liposome (NTL) phospholipids were egg lecithin and cholesterol with a molar ratio of 7:1.

HPLC grade acetonitrile, methanol, o-phosphoric acid, ACS grade dibasic sodium phosphate, sucrose and glucose were obtained from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada). Triton X-100, glutamic acid, Tris-HCl and cycloheximide were purchased from Sigma. The chemicals used to prepare the other buffers and reagents were ACS grade.

HPLC apparatus

The HPLC system was from Waters Associates, Inc. (Milford, MA, USA). It consisted of an injector (Model U6K), two pumps (Model 510), an Automated Gradient Controller (Model 680), a 490 Programmable Multiwavelength UV-Detector and a 740 Data Module as integrator. The system was fitted with guard and analytical columns of μ Bondapack RP C18 (10 μ m).

Preparation of liposomes

Liposomes were prepared by sonication as described previously (19), but with some modifications. The lipid films were hydrated and dispersed in 6 mL of aqueous solution containing 2 mg of Tet or Dox; empty liposomes without antibiotic contained only sterile distilled water. The lipid suspensions were kept at room temperature for 30 min, then submerged in a wet ice-bath and sonicated with an ultrasonicator (Braun-Sonic 2000; Braun Instruments, Burlingame, CA, USA) for 60 sec overall. Unencapsulated antibiotic was removed by centrifugation at 40,000 rpm for 45 min at 4°C in an ultracentrifuge (TL-100 Ultracentrifuge, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA). The liposome pellets were resuspended in sterile distilled water and washed twice as above. The final pellets were resuspended in 4 ml (NTL) or 6 ml (CAL or ANL) of sterile distilled water; the wash water collected and liposome preparations were stored at 4°C for the following assays.

Construction of calibration curves

Five standard dilutions (64 to 4 μ g/ml) of each antibiotic stock solution in water were run in triplicate by HPLC as described below (20), to establish calibration curves, using the areas under the peaks of interest determined by the electronic integrator. Calibration graphs were constructed on semilog paper by plotting the mean peak areas on the log scale against the quantities of working standards on the arithmetic scale.

Determination of encapsulation efficiencies

Lipid vesicles in 0.5 ml of each liposome preparation were disrupted with 0.5 ml of 0.2% Triton X-100 solution for 15 min, at room temperature, with vigorous mixing. The mixture was then centrifuged at 12,000 rpm for 5 min, at room temperature, to pellet the lipids. Antibiotics in the resulting supernatant and washing solution collected previously were quantitated by HPLC (20). The rate of each antibiotic encapsulated into CAL, ANL or NTL was calculated as a percentage of its initial quantity used to prepare the considered liposome.

HPLC conditions Volumes of 0.25 ml of each standard dilution or each sample were injected twice onto columns which were gradient-eluted with mobile phases A [acetonitrile-water-0.2 M phosphate buffer, pH 2.5 (1v/8v/1v)] and B [acetonitrile-water-0.2 M phosphate buffer, pH 2.5 (6v/3v/1v)] at room temperature (20). The mobile phases and the column rinse solution were degassed by sonication prior to their use. The flow rate was 0.9 ml/min; UV absorption was measured at 280 nm and recorder chart speed was 5 cm/min. All assays were performed in duplicate. The columns were rinsed at the end of each assay day with an aqueous solution containing 80% methanol.

Test microorganism

C. trachomatis serovar L₂/434/Bu, obtained from LSPQ (Laboratoire de Santé Publique du Québec, Montreal, QC, Canada), was grown in cycloheximide-treated HeLa 229 cells (ATCC CCL 2.1) also provided by LSPQ. The chlamydial growth medium was aspirated and the resulting cell culture-grown microorganisms resuspended in sucrose-phosphate-glutamic acid (SPG) buffer, pretitrated to yield 6.02×10^8 inclusions of *Chlamydia* per ml and frozen in 0.5-ml aliquots at -70 °C. The cell culture medium consisted of minimal essential medium with Hanks' salts, L-glutamine, non-essential amino acids (Gibco BRL, Life Technologies; Burlington, ON, Canada) and 0.35 g of sodium bicarbonate per liter (Sigma) supplemented with 10 % fetal calf serum (PAA Laboratories, Inc., Exton, PA, USA). This medium was supplemented with 0.5 µg/ml cycloheximide (Sigma) to prepare chlamydial growth medium. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) was used to evaluate antibiotic activities in microbiological assays.

Determination of antichlamydial activities in vitro

HeLa 229 cells were grown in 24-well flat bottom plates, always with coverslips for MIC determinations and only at the last passage for MBC determinations, to produce confluent monolayers. For each experiment four wells were inoculated on the same day, with *C. trachomatis* 10^3 ifu/ml in SPG buffer per well. After centrifugation at 2,100 rpm for 60 min at 30°C, the SPG buffer was aspirated and replaced by 1 ml of serial 2-fold dilutions of each antimicrobial agent in chlamydial growth medium: the antibiotics were diluted from 0.12 to 0.007 µg/ml and from 4.0 to 0.25 µg/ml for MIC and MBC determinations respectively. The plates were incubated for 72 h at 37°C, with 5% CO₂ in air (21). Following incubation, the culture medium was aspirated and the coverslips stained with May-Grünwald Giemsa (MGG) stain for MIC determination. Next, the coverslips were removed from the wells, soaked in acetone, acetone-xylene (v/v) and xylene baths consecutively, dried in air, and mounted on slides for microscopic examination. For MBC determinations, after 72 h incubation the culture medium was removed from the wells and the monolayers washed twice with 1 ml of SPG buffer for 15 min at room temperature, then the cells were scraped off from the wells and passaged to fresh monolayers of HeLa 229 cells in antibiotic-free chlamydial growth medium. Chlamydial inclusions were stained with MGG. All liposomal drug assays were run in parallel on the same day as the liposome free drugs. Each experiment was repeated in triplicate. MIC was determined to be the lowest concentration of the antichlamydial agent at which no inclusion was observed. MBC was established to be the lowest concentration of the antimicrobial agent preventing the formation of inclusions after a second passage in antimicrobial agent-free medium. The relative increase in activity of each liposome preparation was defined by MIC or MBC of the free antibiotic divided by the MIC or MBC of its liposome-encapsulated forms (18).

Data analysis

The results are the geometric means \pm S.E means of independent experiments. Comparisons were made by paired Student's *t*-test: *p* values \leq 0.05 were considered significant.

Results

Encapsulation efficiencies

Dox-entrapment efficiencies were $28.68 \pm 6.41\%$, $49.17 \pm 6.75\%$ and $21.06 \pm 0.84\%$ in CAL-Dox, ANL-Dox and NTL-Dox respectively, while they were $3.53 \pm 0.38\%$ in ANL-Tet and $2.23 \pm 0.66\%$ in NTL-Tet. No Tet was detected in CAL-Tet preparations. There were no significant differences between antibiotic encapsulation efficiencies in ANL-Tet and NTL-Tet ($p = 0.05$), or CAL-Dox and NTL-Dox ($p = 0.17$); however, Dox was more encapsulated than Tet in all liposomes ($p \leq 0.02$) and ANL-Dox entrapped more antibiotic than CAL-Dox or NTL-Dox ($p = 0.01$).

In-vitro antichlamydial activities

Empty liposomes had no inhibitory effect on *Chlamydia*. Table I presents the data on antichlamydial activities *in vitro*. MIC and MBC were 0.06 and 1 $\mu\text{g/ml}$ for Dox, 0.03 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for CAL-Dox, 0.01 and 1 $\mu\text{g/ml}$ for ANL-Dox and 0.03 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for NTL-Dox. They were 0.12 and 4 $\mu\text{g/ml}$ for Tet, 0.01 and 1 $\mu\text{g/ml}$ for ANL-Tet, and 0.03 and 1 $\mu\text{g/ml}$ for NTL-Tet respectively. The inhibitory effect on *Chlamydia* growth was clearly higher with ANL-Tet (10-fold) and ANL-Dox (6-fold) than Tet and Dox respectively. For MBC, the relative increase in antichlamydial activity of Tet was 4-fold with ANL-Tet and NTL-Tet. The elevation of antichlamydial activity was similar (2-fold) with CAL-Dox and NTL-Dox for MBC.

These data showed that Dox- and Tet-encapsulated liposomes were more effective *in vitro* than in their free form.

Discussion

This study was undertaken to assess the encapsulation efficiencies of Tet and Dox in liposomes and to evaluate their antichlamydial activities *in vitro*. The HPLC method used to determine the encapsulation efficiencies of both antibiotics in liposomes is very sensitive, and recovery of antibiotics from standard dilutions and samples was higher than 99% (20). We checked their activity *in vitro* with *B. subtilis* ATCC 6633 as test organism (data not shown). Several studies have reported excellent agreement between HPLC and microbiological methods (20, 22). However, one of the major advantages of HPLC is that

it allows the simultaneous determination of antibiotic degradation products. We found higher encapsulation rates into liposomes with Dox than with Tet. No Tet was detected in CAL-Tet by HPLC, and no antimicrobial activity was observed in microbiological assay with *B. subtilis* ATCC 6633. Although, sample volumes were increased from 0.25 ml to 0.5 ml, only traces of Tet were detected. Thus, this preparation was not used for the following assays.

The antichlamydial activities of the liposome-encapsulated antibiotics were higher than those of their corresponding free drugs. Similar patterns were reported by Al-Awadhi, Stokes and Reich (18) in MIC determinations of liposome-encapsulated Tet. The MIC and MBC values registered in our study with free Tet and Dox were similar to those usually obtained against *C. trachomatis* L₂ and other serotypes (6, 18, 21). Our results showed up to a 10-fold relative increase in activity with the MIC of liposome-encapsulated Tet. The ratios between MIC or MBC values of Dox and its liposomal forms were lower.

Wise and Andrews (23) have evaluated the activities of 2 glycytyclines *in vitro* in comparison with free tetracyclines against 3 clinical isolates of *C. trachomatis* whose serotypes were not indicated. They used McCoy cells infected with approximately 10³ ifu/coverslip, and stained inclusions with a fluorescein-labelled monoclonal antibody. The MICs ranged from 0.5 to 1 µg/ml, and MBCs from 1 to 2 µg/ml for free Tet, while for the 2 glycytyclines the MICs varied between 0.06 and 0.25 µg/ml and MBCs were between 0.12 and 0.5 mg/ml. The latter molecules are new semisynthetic tetracyclines with improved pharmacokinetics and antimicrobial spectra (15, 23). With our cell line (HeLa 229) and MGG staining method, we obtained low MIC values with liposome-encapsulated Tet and Dox close to glycytycline antichlamydial activities (23). Studies on their pharmacokinetics and toxicity *in vitro* performed in our laboratory have shown that they had different patterns of stability in human serum but were not toxic for human erythrocytes and HeLa 229 cells in culture.

These results demonstrate that liposomal Tet and Dox could be very useful as an alternate strategy to antimicrobial therapy. Further studies are now ongoing in our laboratory to evaluate these liposome-encapsulated antibiotics in comparison with their free form in experimental chlamydial infection.

Aknowledgements

We thank J. Lefebvre (LSPQ), M. Noushin, D. Rivas, Dr. O. Agbaba and the technical staff of the Department of Microbiology, Campus Hôtel-Dieu, CHUM, for their valuable assistance.

Presented in part at the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September 28 - October 1, 1997, Toronto, ON, Canada.

Supported by a grant from MRC/PMAC (Pfizer Canada Inc.) and in part, by "Programme Canadien de Bourses de la Francophonie" (PCBF). LS is a recipient of a PCBF scholarship.

References

1. Cates Jr W, Wasserheit J.N. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **164**: 1771-1781.
2. De Schryver A, Meheus A. Epidemiology of sexually transmitted diseases: the global picture. *Bull WHO* 1990; **68**: 639-654.
3. Schachter J. Chlamydial infections. *N Engl J Med* 1978; **298**: 428-435, 540-549.
4. Toomey KE, Barnes RC. Treatment of *Chlamydia trachomatis* genital infection. *Rev Infect Dis* 1990 ; **12 Suppl 6** : 645-655.
5. Sanders LL, Harrison HR, Washington AE. Treatment of sexually transmitted chlamydial infections. *JAMA* 1986; **255**: 1750-1756.
6. Ehret JM, Judson FN. Chlamydiae. In: Raoult D (ed) Antimicrobial agents and intracellular pathogens. Boca Raton: CRC Press, 1993: 201-230.
7. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994; **58**: 686-699.
8. Moulder JW. Intercation of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991; **55**: 143-190.
9. Jones RB. New treatments for *Chlamydia trachomatis*. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **164**: 1789-1793.
10. Mourad A, Sweet RL, Sugg N et al. Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **18**: 696-698.
11. Jones RB, Van Der Pool B, Martin DH et al. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J Infect Dis* 1990; **162**: 1309-1315.

12. Lefevre JC, Lepargneur JP, Guion D et al. Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Path Biol* 1997; **45**: 376-378.
13. Kirst HA. New macrolides: expanded horizons for an old class of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1991; **28**: 787-790.
14. Martin DH, Mroczkowski TF, Dalu ZA et al. A controlled trial of single dose of azithromycin for the treatment of chlamydial urethritis and cervicitis. The azithromycin for chlamydial infections study group. *N Engl J Med* 1992; **327**: 921-925.
15. Tally FT, Ellestad GA, Testa RT. Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines. *J Antimicrob Chemother* 1995; **35** : 449-452.
16. Lopez-Berestein G. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 675-678.
17. Stuhne-Sekalec L, Stanacev, NZ, Djokic S. Liposomes as carriers of macrolides :
preferentiel
association of erythromycin A and azithromycin with liposomes of phosphatidylglycerol
containing unsaturated fatty acid(s). *J Microencapsul* 1991; **8**: 171-183.
18. Al-Awadhi H, Stokes GV, Reich M. Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in
mouse fibroblasts by liposome-encapsulated tetracycline. *J Antimicrob Chemother* 1992;
30 : 303-311.
19. Omri A, Ravaoarinoro M, Poisson M. Incorporation, release and in vitro antibacterial
activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob
Chemother* 1995; **36**: 631-639.
20. Tsuji K, Robertson JH. Analysis of tetracycline in pharmaceutical preparations by
improved
high-performance liquid chromatographic method. *J Pharm Sci* 1976; **65** : 400-404.
21. Kimura M, Kishimoto T, Niki Y et al. In vitro and in vivo antichlamydial activities of
newly developed quinolone antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:
801-803.
22. Ray A, Harris R. High-performance liquid chromatography as an alternative to
microbiological measurements in the assay of tetracyclines. *J Chromatogr* 1989; **467**: 430-
435.
23. Wise R, Andrews JM. In vitro activities of two glycylcyclines. *Antimicrob Agents
Chemother* 1994; **38**: 1096-1102.

Table legend

Table I: In-vitro antichlamydial activities of free and liposome-encapsulated tetracycline and doxycycline.

Table I: In-vitro antichlamydial activities of free and liposome-encapsulated tetracycline and doxycycline.

Drugs formulations	Antichlamydial activities <i>in vitro</i> ($\mu\text{g/mL}$)		Relative increase in activity	
	MIC	MBC	MIC	MBC
-Tet	0.12	4.0	1	1
-ANL-Tet	0.01	1.0	10	4
-NTL-Tet	0.03	1.0	4	4
-Dox	0.06	1.0	1	1
-CAL-Dox	0.03	0.5	2	2
-ANL-Dox	0.01	1.0	6	1
-NTL-Dox	0.03	0.5	2	2

Tet: tetracycline; Dox: doxycycline; cationic liposome-encapsulated doxycycline (CAL-Dox); anionic liposome-encapsulated tetracycline (ANL-Tet) and doxycycline (ANL-Dox); neutral liposome-encapsulated tetracycline (NTL-Tet) and Dox (NTL-Dox).

CHAPITRE 5, ARTICLE 3:**INHIBITION IN-VITRO DE LA CROISSANCE DE *Chlamydia trachomatis* PAR DES CYCLINES ENCAPSULÉES
DANS LES LIPOSOMES**

**In - vitro inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by
liposome-encapsulated cyclines**

SANGARÉ L., MORISSET R. et RAVAOARINORO M.

Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada

Département de Microbiologie et Infectiologie, Campus Hôtel-Dieu, CHUM
3840 Rue Saint Urbain, Montréal, Québec H2W 1T8, Canada
Tél.: +1 (514) 843-2675; Fax: +1 (514) 843-2625

Soumis à *Pathologie Biologie*

INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis est la première cause de maladies sexuellement transmissibles d'étiologie bactérienne dans le monde. Les complications de l'infection urogénitale non convenablement traitée, peuvent engendrer une stérilité [8]. Le développement intracellulaire absolu du microorganisme limite l'éventail des antimicrobiens qui peuvent être utilisés pour lutter contre les chlamydioses. Les cyclines et les macrolides sont les plus couramment utilisés; mais des cas d'échecs thérapeutiques ont été rapportés [2]. Par ailleurs, il a été fait cas de résistance *in vitro* à l'érythromycine [6] et à la tétracycline [3,4], mais les mécanismes restent inconnus. Plusieurs stratégies ont été développées pour lutter plus efficacement contre les chlamydioses, notamment la mise au point de nouvelles molécules [2, 10]. L'utilisation de système de transport comme les liposomes, qui augmenterait la concentration intracellulaire et le temps d'activité des antichlamydiens, pourrait constituer une autre alternative [5]. Dans cette étude, nous avons déterminé les activités antichlamydiennes *in vitro*, des formulations liposomales de la tétracycline (Tet) et de la doxycycline (Dox). Le dénombrement des inclusions a permis d'évaluer l'inhibition de l'infectivité chlamydienne sous l'influence des différentes dilutions des formulations liposomales et des antibiotiques sous leur forme libre.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Microorganisme

La souche de *C. trachomatis* L₂ /434/Bu a été cultivée sur cellules HeLa 229. Les corps chlamydiens purifiés ont été dilués dans du tampon sucrose-phosphate - acide glutamique (SPG) et prétitrés pour obtenir $6,02 \times 10^8$ unités formant inclusion (ufi) /ml: des aliquots de 0,5 ml ont été conservés à -70°C. Le milieu de culture cellulaire était composé de MEM avec les sels de Hanks, la L-glutamine, les acides aminés non essentiels (Gibco BRL) et de 0,35 g/l de bicarbonate de sodium, additionnés de 10% de sérum foetal de veau (PAA Laboratories). Le cycloheximide (Sigma) à 0,5 µg/ml a été ajouté à ce milieu pour la culture des *Chlamydia*.

2. Antichlamydiens testés

Les antichlamydiens utilisés ont été la tétracycline (Sigma) et la doxycycline (Pfizer) sous formes libres, non encapsulées dans les liposomes, et encapsulées par sonication dans les

liposomes cationiques (CaL), anioniques (AnL) et neutres (NtL) [7]. Les concentrations de Tet étaient de $12,6 \pm 4,6$ $\mu\text{g/ml}$ dans les AnL-Tet et de $10,6 \pm 3,0$ $\mu\text{g/ml}$ dans les NtL-Tet; les concentrations de Tet dans les CaL-Tet étaient très faibles pour que cette formulation soit testée. Celles de la Dox étaient de $93,5 \pm 38,9$ $\mu\text{g/ml}$, $146,0 \pm 18,5$ $\mu\text{g/ml}$, et $90,5 \pm 6,5$ $\mu\text{g/ml}$ dans les CaL-Dox, AnL-Dox et NtL-Dox respectivement [7].

3. Détermination des CMI et des CMB

Pour chaque expérience, les feuillets confluents de 24 h de cellules HeLa 229 produits dans des plaques de 24 puits avec ou sans lamelles, ont été inoculés avec *C. trachomatis* à 10^3 ufi. Chaque dilution d'antibiotique dans du milieu de culture de *Chlamydia* (CMI: 0,007 à 0,25 $\mu\text{g/ml}$; CMBs: 0,25 à 4 $\mu\text{g/ml}$) a été testée dans 2 puits pour la détermination de CMI et dans 2 autres puits pour chaque détermination de CMB. Après 72 h d'incubation à 37°C sous 5 % de CO₂, les lamelles de CMI ont été colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa et les inclusions détectées au microscope au grossissement $\times 400$. Les CMB₁ et CMB₂ ont été déterminées après un second et un troisième passage en milieu de culture de *Chlamydia* sans antibiotique. Chaque formulation liposomale a été testée 3 fois en parallèle avec l'antibiotique libre, en utilisant à chaque fois une nouvelle préparation de liposomes. La CMI a été définie comme étant la plus faible concentration d'antichlamydien à laquelle aucune inclusion typique n'est observée. Les CMB₁ et CMB₂ ont été définies comme étant les plus faibles concentrations d'antichlamydiens qui ne permettent pas la formation d'inclusion après un second et un troisième passages en milieu sans antibiotique.

4. Évaluation de l'inhibition de l'infectivité chlamydiennne

Les inclusions ont été dénombrées pour chaque dilution d'antibiotique testée pour évaluer l'importance de l'inhibition de la croissance chlamydiennne. Lorsque le nombre d'inclusions était supérieur à 100, l'estimation était faite à partir de la moyenne du nombre d'inclusions obtenue dans 30 champs microscopiques.

RÉSULTATS

1. Activités antichlamydiennes

Les préparations liposomales sans antibiotiques n'ont pas d'activité antichlamydiennne. La CMI des AnL-Tet s'exerce à une concentration 8 fois inférieure à celle de la Tet et 2 fois

inférieure à celle de NtL-Tet (Tableau I). La CMI des AnL-Dox est 6 fois inférieure à celle de la Dox et 3 fois inférieure à celles des CaL-Dox et NtL-Dox. Les CMB₁ des formulations liposomales se sont exercées à des valeurs 2 à 4 fois inférieures à celles des antibiotiques libres, à l'exception des AnL-Dox. Les CMB₁ et CMB₂ étaient identiques pour les AnL-Tet, NtL-Tet et Tet. Les CMB₂ des autres antichlamydiens étaient supérieures à leur CMB₁, traduisant ainsi des activités beaucoup plus incomplètes à court terme.

2. Inhibition de la croissance chlamydienne

Les résultats obtenus avec les CMB₁ montrent une inhibition plus importante de la croissance chlamydienne par les préparations liposomales de Dox à 0,25µg/ml que par la même concentration de Dox libre (Tableau II). La croissance chlamydienne est inhibée à plus de 99% à de faibles concentrations de Tet ou de Dox, mais elle reste incomplète. Pour 0,5µg/ml de ANL-Tet, les CMB₁ et CMB₂ sont identiques sans augmentation du nombre d'inclusions par champ microscopique, contrairement aux autres antichlamydiens testés. L'étude d'influence des concentrations d'antibiotique sur la croissance chlamydienne montre que les formulations liposomales exercent de plus importantes inhibitions que les antibiotiques libres correspondants.

DISCUSSION

Les seuls travaux connus sur l'encapsulation d'antichlamydiens dans des liposomes portent sur deux macrolides [9] et la tétracycline [1]. Aucune étude de sensibilité de *Chlamydia* à ces formulations liposomales de macrolide n'a été réalisée. Par contre, la tétracycline liposomale a été testée *in vitro* contre *C. trachomatis* en culture: les résultats rapportés sont proches de ceux de notre étude avec la Tet. Les activités antichlamydiennes de la Dox que nous avons obtenues concordent avec celles habituellement rapportées [2]. Les formulations liposomales de Tet et de Dox dans notre étude, ont des activités antichlamydiennes supérieures à celles des antibiotiques correspondants non encapsulés. L'inhibition qu'elles exercent sur la croissance de *C. trachomatis*, après les seconds et troisièmes passages en milieu sans antibiotiques, est aussi incomplète que celles observées avec les antibiotiques non encapsulés. La CMB₂ a été déterminée dans cette étude pour vérifier la capacité inhibitrice réelle, voire bactéricide, des antichlamydiens étudiés. Ces

données traduisent des activités bactériostatiques, à l'exception des AnL-Tet dont les CMB₁ et CMB₂ sont identiques et qui pourraient révéler une bactéricidie.

Les causes d'échecs thérapeutiques des chlamydioses sont surtout attribuées aux effets indésirables des antibiotiques administrés et à la longue durée des traitements prescrits qui incommode les patients. À ce jour, aucun cas de résistance *in vivo* n'a été rapporté. Mais l'absence de standardisation des méthodes d'étude de sensibilité aux antibiotiques utilisées en routine ne facilitent pas la caractérisation de souches qui pourraient être impliquées dans ces échecs thérapeutiques [2].

Nos résultats montrent que l'utilisation de formulations liposomales de Tet et de Dox pourrait être une alternative thérapeutique dans les chlamydioses. Elles sont en cours d'évaluation dans notre laboratoire, en comparaison avec les antibiotiques libres, dans des infections chlamydiennes expérimentales chez un modèle murin.

RÉFÉRENCES

1. AL-AWADHI H., STOKES G.V., REICH M.- Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in mouse fibroblasts by liposome-encapsulated tetracycline. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1992, 30, 303-311.
2. EHRET J.M., JUDSON F.N.- Chlamydiae. In: Raoult D.- *Antimicrobial agents and intracellular pathogens*, pp.201-230, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1993.
3. JONES R.B., VAN DER POL B., MARTIN D.H., SHEPARD M.K.- Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 1990, 162, 1309-1315.
4. LEFÈVRE J.C., LEPARGNEUR J.P., GUION D., BEI S. - Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Path. Biol.*, 1997, 45, 376-378.
5. RAVAOARINORO M., TOMA E.- Les liposomes dans le traitement des infections. *Ann. Med. Interne*, 1993, 144, 182-187.
6. MOURAD A., SWEET R.L., SUGG N., SCHACHTER J.- Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, 18, 696-698.
7. SANGARE L., MORISSET R., RAVAOARINORO M.- Incorporation rates, stabilities, cytotoxicities and release of liposomal tetracycline and doxycycline in human serum. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, 42, 831-834.

8. SCHACHTER J.- Chlamydial infections. *West. J. Med.*,1990, 153, 523-534.
9. STUHNE-SEKALEC L., STANACEV N.Z., DJOKIC S.-Liposomes as carriers of macrolides: preferential association of erythromycin A and azithromycin with liposomes of phosphatidylglycerol containing unsaturated fatty acid(s). *J. Microencapsul.*,1991,8,171-183
10. TALLY F.T., ELLESTAD G.A., TESTA R.T.- Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1995, 35, 449-452.

LÉGENDES DES TABLEAUX

TABLEAU I: Activités antichlamydiennes (Antichlamydial activities).

TABLEAU II: Influences des concentrations des antibiotiques testés sur l'inhibition de l'infectivité chlamydienne (Effect of antibiotic concentrations on chlamydial infectivity).

RÉSUMÉ

Les activités antichlamydiennes de la tétracycline (Tet) et de la doxycycline (Dox) encapsulées dans des liposomes cationiques (CaL), anioniques (AnL) et neutres (NtL) ont été évaluées *in vitro*, sur des cellules HeLa 229 inoculées avec *Chlamydia trachomatis* L₂/434/Bu à 10³ unités formant inclusions. Après 72 h d'incubation à 37°C sous 5 % de CO₂, les inclusions chlamydiennes ont été colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa pour établir les CMI. Les CMB₁ et CMB₂ ont été déterminées après un second et un troisième passage en milieu dépourvu d'antibiotique. Les inclusions chlamydiennes ont été dénombrées pour évaluer l'importance de l'inhibition de la croissance exercée par chaque dilution d'antibiotique testée pour les déterminations de CMB₁ et de CMB₂. Les CMI, CMB₁ et CMB₂ (µg/ml) des différents antichlamydiens ont été: Tet (0,12; 4; 4), AnL-Tet (0,01;1; 1), NtL-Tet (0,03; 1; 2), Dox (0,06; 1; 2), CaL-Dox (0,03; 0,5; 2), AnL-Dox (0,01; 1; 2) et NtL-Dox (0,03; 0,5; 0,5). Les formulations liposomales de la Tet et de la Dox ont été plus actives que leur forme non encapsulée. L'inhibition de croissance chlamydienne exercée par les AnL-Tet pourrait être de nature bactéricide. Les formulations liposomales de ces antibiotiques pourraient être importantes dans le traitement des infections chlamydiennes.

MOTS-CLÉS: *Chlamydia trachomatis*, doxycycline, tétracycline, liposomes.

SUMMARY: In - vitro inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by liposome-encapsulated cyclines

The antichlamydial activities of doxycycline (Dox) and tetracycline (Tet) encapsulated in cationic (CaL), anionic (AnL) and neutral (NtL) liposomes were evaluated *in vitro* by adding serial dilutions of antibiotics (MIC: 0.12 to 0.007 µg/ml; MBC: 4 to 0.25µg/ml) to HeLa 229 cell monolayers inoculated with *Chlamydia trachomatis* L2/434/Bu (10^3 ufi/ml). After 72-h incubation at 37°C, chlamydial inclusions were stained by the May-Grünwald Giemsa method to establish MICs. MBC₁ and MBC₂ were determined in antichlamydial agent-free medium after second and third passages. The chlamydial inclusions were counted to assess chlamydial growth at each antibiotic dilution tested for MBC₁ and MBC₂ determinations. MIC, MBC₁ and MBC₂ (µg/ml) were: Tet (0.12; 4; 4), AnL-Tet (0.01; 1; 1), NtL-Tet (0.03; 1; 2), Dox (0.06; 1; 2), CaL-Dox (0.03; 0.5; 2), AnL-Dox (0.01; 1; 2) and NtL-Dox (0.03; 0.5; 0.5). Liposome-encapsulated drugs were more active than their corresponding unencapsulated antibiotics. Inclusion count showed higher inhibitory activities of liposomal drugs on chlamydial growth, and AnL-Tet was bactericidal. Liposome-encapsulated drugs could be useful in antichlamydial therapy.

KEY-WORDS: *Chlamydia trachomatis*, doxycycline, tetracycline, liposomes.

TABLEAU I: Activités des antichlamydiens

Antichlamydiens	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	^a Rapport de dilution	CMB ₁ ($\mu\text{g/ml}$)	^a Rapport de dilution	CMB ₂ ($\mu\text{g/ml}$)	^a Rapport de dilution
Tet	0,12	-	4,0	-	4,0	-
AnL-Tet	0,01	3	1,0	2	1,0	2
NtL-Tet	0,03	2	1,0	2	2,0	1
Dox	0,06	-	1,0	-	2,0	-
CaL-Dox	0,03	1	0,5	1	2,0	-
NaL-Dox	0,01	2	1,0	-	2,0	-
NtL-Dox	0,03	1	0,5	1	0,5	2

Tet: Tétracycline; Tétracycline encapsulée dans les liposomes anioniques (AnL-Tet), et neutres (NtL-Tet); Dox: Doxycycline; Doxycycline encapsulée dans les liposomes anioniques (AnL-Dox), cationiques (CaL-Dox) et neutres (NtL-Dox).

^a: Rapport de dilution entre l'antichlamydien encapsulé et sa forme libre.

TABLEAU II: Influences des concentrations des antibiotiques testés sur l'inhibition de la croissance chlamydienne *in vitro*.

Antichlamydiens		Pourcentage d'inhibition selon les concentrations testées					
		0 ^a	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
Tet	CMB ₁	^b 196,33	99,47	99,79	99,89	99,99	100
	CMB ₂	126,75	29,94	70,34	78,07	98,42	100
AnL-Tet	CMB ₁	196,33	33,68	99,99	100	100	100
	CMB ₂	126,75	99,84	99,99	100	100	100
NtL-Tet	CMB ₁	196,33	99,99	100	100	100	100
	CMB ₂	126,75	95,01	99,91	99,99	100	100
Dox	CMB ₁	73	34,70	99,40	99,99	100	100
	CMB ₂	157	39,10	72,61	94,91	100	100
CaL-Dox	CMB ₁	73	99,67	99,98	100	100	100
	CMB ₂	157	43,57	78,22	99,90	100	100
AnL-Dox	CMB ₁	73	99,80	99,99	100	100	100
	CMB ₂	157	53,89	86,75	99,95	100	100
NtL-Dox	CMB ₁	73	99,98	100	100	100	100
	CMB ₂	157	99,77	100	100	100	100

^a: Concentrations d'antichlamydiens testées ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^b: Nombre moyen d'inclusions par champs ($\times 400$) pour les témoins de culture positive sans antibiotique.

CHAPITRE 6: ARTICLE 4

Effects of cationic liposome-encapsulated doxycycline on experimental *Chlamydia trachomatis* genital infection in mice

L. Sangaré^a, R. Morisset^a, L. Gaboury^b, and M. Ravaoarino^{a*}

Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec;

^a Department of Microbiology and Infectiology, and ^b Department of Pathology, Hôtel-Dieu Campus, CHUM, 3840 St Urban Street, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

Telephone: (514) 843-2675; Fax: (514) 843-2625

Running heading: liposomal doxycycline in murine chlamydial infection

* Reprint requests: Madeleine Ravaoarino, PhD, Department of Microbiology and Infectiology, Hôtel-Dieu CHUM, 3840 St. Urbain Street, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada. Telephone: +1 (514) 843-2675; Fax: +1 (514) 843-2625

Soumis à *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*

Summary

In a previous study, we demonstrated that cationic liposome encapsulated-doxycycline (CaL-Dox) was 2-fold more effective than free Dox against *Chlamydia trachomatis* *in vitro*. Here, we evaluated the effects of 2 CaL-Dox regimens in comparison to unencapsulated Dox on the course of chlamydial genital infection in mice. Progesterone-treated, female CF-1 mice were challenged each intravaginally with 1.2×10^5 ifu of *C. trachomatis* L₂ /434/Bu in 20 μ L of sucrose-phosphate-glutamic acid buffer. Two days postinfection, the animals were divided into 4 treatment groups for intramuscular (im) injection of Dox at 10 mg/kg of body weight once a day for 3 (3 Dox) or 7 days (7 Dox), or of CaL-Dox at the same dose level for 3 (3 CaL-Dox) or 7 days (7 CaL-Dox) consecutively. An infected fifth group served as controls and were given empty CaL preparation. The course of infection in antichlamydial-treated and control mice was monitored bacteriologically, serologically and histologically by sacrificing the animals 2 days post-inoculation (before treatment began), 3 days post-treatment and weekly thereafter for 5 weeks, until cortisone treatment was started. Two days after the last sacrifice, the remaining mice were injected subcutaneously with hydrocortisone sodium succinate at the dose level of 125 mg/kg of body weight/day for 6 consecutive days. These mice were sacrificed 2 days after the last cortisone injection. *C. trachomatis* were isolated after 5 blind passages from 82% of infected control mice, 61.4% of 3 Dox, 52.2% of 3 CaL-Dox, 29% of 7 Dox and 20% of 7 CaL-Dox animals. Histopathological reactions were found in various tissues of the genital tract in 79.5% of infected control mice, 80.9% of 3 Dox, 65.2% of 3 CaL-Dox, 47.1% of 7 Dox and 25.7% of 7 CaL-Dox animals. Total antichlamydial antibodies titers were lower in 7 CaL-Dox mice than in all other groups ($P < 0.005$). The results showed that progesterone-treated CF-1 mice are suitable for both lower and upper genital tract infection with a LGV biovar strain of *C. trachomatis*. Neither 7 CaL-Dox nor 3 CaL-Dox treatment was more effective than unencapsulated 7 Dox doses in the bacteriological cure of chlamydial genital infection in mice. However, 7 CaL-Dox prevented tissue damage in the genital tract significantly more than all the other regimen ($P < 0.05$). These results suggest that liposome-encapsulated Dox, particularly CaL-Dox, may have potential for the treatment of chlamydial infections in the clinic.

Introduction

Chlamydia trachomatis is a major bacterial agent in sexually transmitted diseases worldwide.^{1,2} In women, chlamydial cervicitis may ascend in the genital tract and result in endometritis and salpingitis that, in turn, can lead to ectopic pregnancy or infertility.^{1, 3, 4} New born infants exposed to *C. trachomatis* in the birth canal may develop pneumonitis or conjunctivitis.^{1,4} In men, the pathogen is responsible for urethritis, and coinfections with *Neisseria gonorrhoeae* are frequent in both heterosexual and homosexual men. Moreover, *C. trachomatis* is associated with epididymitis and prostatitis. Lymphogranuloma venereum (LGV) occurs in both men and women. Recent studies have revealed that chlamydial infections of the lower genital tract can be an important risk factor of acquired sexual transmission of HIV.⁵ These bacterial infections are a public health problem in both industrialized and developing countries.²

Currently, tetracyclines, macrolides including azalides, and the newer fluoroquinolones are drugs of choice in monomicrobial urogenital infections due to *C. trachomatis*.^{6, 7} However, some other pathogens are often associated with *C. trachomatis* in genital infections. In such polymicrobial infections, the drugs used should be active against all the pathogens that could be involved. However, all these drugs must be given twice or more, for at least 7 days, except for azithromycin, and they often cause adverse reactions that lead to poor compliance as well as therapy failure.⁶ In such cases, *Chlamydia* is not completely eradicated so that the infection may persist and contribute to the development of complications. Moreover, relative resistance *in vitro* of *C. trachomatis* clinical strains to certain tetracyclines and macrolides has been reported.^{8, 9, 10} Although no *C. trachomatis* clinical strains resistant to fluoroquinolones have been isolated to date, a quinolone-resistant mutant has been found *in vitro*.¹¹

Various strategies, including the development of new molecules and the improvement of existing drug formulations by the use of carriers such as liposomes have been elaborated to overcome these problems. We have reported previously that liposome-encapsulated tetracycline and Dox are more active than their free forms against *C. trachomatis in vitro*.¹² Several animal models, including mice, have been used to study the pathogenesis of chlamydial strains in urogenital infections and to evaluate the actions of antibiotics.^{13, 14} Ito et al.¹⁵ have shown that progesterone-pretreated CF-1 mice are variously susceptible to chlamydial strains of trachoma biovar. No detailed description of the histopathological

reactions in tissues of the upper genital tract is available for this model. To the best of our knowledge, no study has yet reported infection of these animals with a strain belonging to the LGV biovar of *C. trachomatis*. In the present investigation, we have demonstrated that progesterone-treated CF-1 mice are susceptible to genital infection with *C. trachomatis* L₂/434/Bu, and we have evaluated the effects of 2 cationic liposome-encapsulated Dox regimens in this model in comparison with unencapsulated Dox on the course of chlamydial genital infection.

Materials and Methods

1. Organism

C. trachomatis L₂/434/Bu provided by LSPQ (Laboratoire de Santé Publique du Québec, Montreal, QC, Canada) was grown in HeLa 229 cells (ATCC CCL 2.1).¹² Elementary bodies (EB) were purified from infected, harvested and ultrasonically-disrupted cells,¹⁶ then resuspended in sucrose-phosphate-glutamic acid (SPG) buffer, pH 7.4, in 0.5-mL aliquots of 6.02×10^6 ifu/mL. Before the serological assay of the antigen preparations, EB in SPG buffer were further concentrated by centrifugation in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.0, to achieve a concentration of $\sim 6.02 \times 10^9$ ifu/mL. Aliquots were stored at -70 °C until their use.

2. Drugs

The drugs were Dox hydrochloride (Pfizer, New York, NY, USA) and its cationic liposomal formulation CaL-Dox (93.5 ± 38.9 µg/mL). The phospholipids consisted of egg lecithin, stearylamine and cholesterol in a 7:2:1 molar ratio. CaL-Dox was prepared by sonication and stored at 4°C for use in the same week.^{12, 17}

3. Inoculation of mice

Three hundred and forty female CF-1 mice, 31 to 36 days old and weighing 16 to 18 g, were obtained from Charles River Canada Inc. (Montreal, Qc, Canada). Prior to the experiments, freedom from *Chlamydia* and *Mycoplasma* contamination was verified in 3 animals. Ten and 3 days prior to inoculation, the mice were injected subcutaneously (sc) with 2.5 mg of progesterone (Depo-Provera, Upjohn, Don Mills, ON, Canada) in 0.1 mL of injectable stérile water: 320 mice under ketamine-xylazine (Bayer, Etobicoke, ON, Canada)

anesthesia were inoculated by pipette tips with 1.2×10^5 ifu in 20 μ L of SPG buffer, and 20 uninfected controls received 20 μ L of sterile SPG buffer. They were maintained in an inverted position until recovery from anesthesia.¹⁸

4. Treatment

Two days post-inoculation (pi), the animals were separated into 4 treatment groups of 70 mice each: in the first and second groups, each mouse received intramuscular (im) injections of Dox at the dose level of 10 μ g/g/day for 3 (3 Dox) and 7 (7 Dox) consecutive days, respectively. In the other two 70-mice groups, each animal was given im injections of CaL-Dox at the dose level of 10 μ g/g/day for 3 (3 CaL-Dox) and 7 (7 CaL-Dox) consecutive days, respectively. Forty infected mice received 0.1 mL of empty CaL preparation and the 20 uninfected controls, only 0.1 mL of sterile water for 7 days.

5. Specimen collection

To monitor the course of infection and the treatment regimens, the first (s1) samples were collected 2 days pi, before the treatments began, 3 days (s2) after the completion of treatments and weekly thereafter (s3 to s7), until cortisone administration. Cervico-vaginal swabs were taken from 1 to 11 mice under Enflurane (Abbott Laboratories Ltd., Montreal, Qc, Canada) anesthesia, in each treatment and control group, and expressed in 1 mL of SPG buffer, pH 7.4, containing vancomycin (100 μ g/mL), gentamicin (50 μ g/mL) and amphotericin B (25 μ g/mL) and frozen at -70°C until cultivation. The mice were then dissected, and blood samples were collected for serological assays. The entire genital tract was removed and placed in 10% buffered formalin for histological examination.

6. Cortisone injection

Two days after the 7th specimen collection (s7), all the remaining mice in each treatment and control group were injected with hydrocortisone sodium succinate (Abbott Laboratories Ltd.), at the dose level of 125 mg/kg of body weight per day for 6 consecutive days. Two days after the last injection, all these mice were sacrificed and samples were collected as described previously.

7. Assessment of drug efficacy of antichlamydial regimens

a. Cell culture isolation: 0.25 mL of cervico-vaginal specimens in SPG buffer was cultured in drug-free medium on 24-h-old HeLa 229 cell monolayers in 24-well plates. Four wells were used for each sample, and after 5 blind passages, the coverslips were subjected to May-Grünwald-Giemsa staining to detect chlamydial inclusions by microscopic examination.¹²

b. Serology: Serum was diluted 2-fold (1:512 to 1:2) in 0.01 M PBS, pH 7.0, and the total antibody titer was determined by a variation of the microimmunofluorescence (micro-IF) technique described by Wang and Grayston,¹⁹ using a goat anti-mouse polyvalent immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) fluorescein isothiocyanate conjugate (Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, MO, USA). Titers were given by the highest serum dilution with definite fluorescence of *C. trachomatis* EB on slide examinations under a fluorescence microscope.

c. Histopathology: The genital tract was embedded in paraffin, and sections were stained with hematoxylin and eosin. The sections examined included the cervico-vaginal portion, uterus, fallopian tubes and ovaries. Histopathological changes occurring at various sites of the genital tract were evaluated via inflammatory reactions:¹⁴ any genital tract section with histopathological reactions was considered abnormal.

8. Statistical analysis

The results were analyzed by various Chi-square test, Student's *t*-test or Fisher's exact test, using SAS monospace software. *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

1. Bacteriological tests

Progesterone pretreatment contributed to effective genital tract infection of mice with human isolates of *C. trachomatis*. Five blind passages in drug-free medium were run for each cervico-vaginal swab. Cultures were negative in all uninfected control mice positive in 82% of infected controls, 61.4% of 3 Dox, 52.2% of 3 CaL-Dox, 29 % of 7 Dox and 20% of 7 CaL-Dox animals: the infection rates were significantly lower in all treatment regimens than in infected control mice ($P < 0.05$), excepted for the 3 Dox regimen. There

was no difference between the overall rates of positive culture in Dox- and CaL-Dox-treated mice ($P: 0.112$): the difference from positive control mice was not due to the drug formulation. However, mice in the 3 dose regimen (56.8%) were significantly more infected than those given 7 doses (24.5%)($P:0.001$). Although there were fewer infected animals with 7 CaL-Dox than with 7 Dox, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$).

Two days pi (s1), chlamydial inclusions were found in cervico-vaginal swab culture from all positive controls and from mice in all treatment regimens, excepted 1 mouse from the 7 CaL-Dox group. In week 7 (s7), 4 of 6 mice among the positive controls and 6/11 in 3 Dox were culture-positive, whereas in this same time, none was found to be positive with the 3 CaL-Dox regimen. One mouse was culture-positive with both 7 Dox and 7 CaL-Dox. After cortisone therapy, cervico-vaginal swab culture in s8 showed an increase of the infection rate among untreated infected control (6/8), 3 Dox (7/10), 3 CaL-Dox (5/10) and 7 Dox (3/10) mice, while only 1/10 was positive in the 7 CaL-Dox group.

2. Serology

Total serological antibody (IgM, IgG and IgA) titers were measured by micro-IF and their kinetics were analyzed by using the geometric mean of titers from each period of sacrifice (s1 to s8). Nine out of 20 uninfected mice (negative controls) showed total antibody titers of 1:8: thus, any serum with an total antibody titer equal to or greater than 1:16 was considered positive. Table I enumerates the results of serological tests in positive controls and mice from the various treatment groups. The antichlamydial antibody titers detected in s1, were lower in 7 CaL-Dox mice than in those from all the other groups. Total antibodies reached peak titers in the positive controls by s6, later than in 3 Dox (s3), 3 CaL-Dox, 7 Dox and 7 CaL-Dox (s5). After cortisone therapy, no increase in the total antibody titer was detected in 7 CaL-Dox mice unlike the other groups.

3. Histopathological reactions

All sections of the genital tract were examined with an optical microscope to assess the presence of pathological changes such as infiltration with polymorphonuclear leukocytes (acute inflammation), mononuclear leukocytes (chronic inflammation), plasma cells, fibrosis, epithelial erosion (excluding mesosalpinx) and oviduct dilatation. Examples of

these pathological changes are shown in Figures 1, 2 and 3. Genital tract tissues were considered abnormal when at least 1 of these parameters was present. The results are given as the percentage of animals with abnormal tissue sections in their genital tract. No abnormal ovary was found and no uninfected mice had pathological changes in their genital tract. Table II presents the overall results in positive controls and treated mice. Pathological changes occurred more in untreated mice than in antichlamydial-treated animals ($P: 0.001$). Likewise, the overall rate of abnormal genital tract tissues was higher with the 3-dose antichlamydial regimens than with the 7-doses regimens ($P: 0.001$). Moreover, the overall rate was higher in mice treated with Dox than in those given the CaL-Dox regimens: this difference due to drug formulation was significant ($P: 0.002$). The results were comparable between 3 CaL-Dox and 7 Dox ($P > 0.05$) whereas the rates were significantly lower with 7 CaL-Dox than with 7 Dox and 3 CaL-Dox.

Histopathological reactions were detected in cervico-vaginal sections in the s1 period in the positive controls and in all treatment regimen mice. Endometritis and salpingitis appeared in the s1 period in the positive controls, 3 Dox and 3 CaL-Dox mice, while in the 7 Dox group, endometritis was detected from s6, and salpingitis from s8. In 7 CaL-Dox mice, endometritis was noted in s7 and s8, and the sole case of salpingitis was found in s7. Inflammatory reactions reached their peak level in the uterus and fallopian tube in s3 and s4 respectively. Inflammatory infiltrates with necrosis and abscess formation (Figure 1, B) were found in cervico-vaginal, uterine and oviduct tissues. Filling of the lumens of the cervix, uterus and oviducts with polymorphonuclear leukocytes and fibrosis of the endometrial stroma were not very frequent. In a few positive control animals, the histopathological reactions were present in both tubes. Histopathological changes over time were similar in severity among the positive controls and 3 Dox animals, unlike those in the 7 CaL-Dox group, and, moreover, the inflammatory lesions were less extensive and pronounced.

These results demonstrated that the 7 CaL-Dox regimen was the most protective against ascending chlamydial genital infection in mice.

Discussion

A number of experimental systems have been employed to study the pathogenesis of chlamydial diseases and to evaluate the action of antimicrobial drugs on the pathogen. Mice

inoculated by various routes have been widely used for experimental genital infection with *Chlamydia* and to prove that *C. trachomatis* is an etiological agent in pelvic inflammatory disease.^{13, 14} However, Ito et al.²⁰ were able to establish genital tract infection in mice with a human oculogenital strain by intravaginal inoculation. They showed that without progesterone, the animals could only be infected during 3 specific stages of the estrous cycle, when leukocytes are present. Later, they inoculated progesterone-treated female CF-1 mice intravaginally with 7 human trachoma biovar strains of *C. trachomatis* and observed differences in the duration of infection and their invasiveness; although they demonstrated that virulent strains such as immunotypes E and D cause uterine infection, no histopathological data were provided.¹⁵ The lymphogranuloma venereum (LGV) chlamydial serotypes are thought to be more invasive than trachoma biovar strains. To date, no genital infection with a LGV strain in CF-1 mice has been reported; in the present study we infected mice with a strain of *C. trachomatis* serovar L₂ and showed that it was able to induce ascending infection and histopathological changes in the upper genital tract. With serial blind passages in drug-free medium, the pathogen could be detected from cervico-vaginal swab cultures for up to 9 weeks.

To counter the decreased microbial susceptibility to available drugs, several strategies have been developed: in infectiology, these include the use of liposomes as carriers to achieve high concentrations of active drugs in the target infectious site and possibly to reduce their dose levels. Sangaré et al.¹⁷ and Al-Awadhi et al.²¹ showed that liposome-encapsulated tetracyclines are more effective than their free forms on *C. trachomatis* in cellular systems *in vitro*. In a previous study, we also demonstrated *in vitro* that CaL-Dox possesses antimicrobial and pharmacokinetic properties that could allow its use *in vivo*.^{12, 17} The inhibitory effect on growth of *C. trachomatis* *in vitro* was 2-fold greater with CaL-Dox than with free Dox. Thus, we evaluated 2 treatment regimens of CaL-Dox in the mouse model of genital tract infection developed in our laboratory, in comparison with the same regimen of the free drug. Usually, even in experimental animal models, Dox is given twice a day at a dose level of 10 µg/g of body weight for 7 days or longer: in view of this dosage, a comparative study of both free and liposomal Dox could provide more data on the therapeutic effectiveness of CaL-Dox. The treatment regimen of 3 CaL-Dox doses was assessed to determine if reduced doses are as effective as the 7 doses regimen of free Dox.

A number of investigators have evaluated the effect of tetracycline antibiotics on chlamydial genital infections in murine models:¹³ most of them used either non-human isolates of *Chlamydia* or non-natural routes to inoculate the animals.²²⁻²⁴ They showed that early treatment, starting before inoculation or within the first days, could lead to the bacteriological cure, and substantially prevent elevation of total serological antichlamydial antibody titers as well as severe tubal damage. Various factors, including virulence of the chlamydial strain used, influence the induction of pathological changes in upper genital tissues and the subsequent infertility.²⁵ And Jones et al.²⁶ reported that chlamydial culture from urogenital specimens could be substantially improved by serial passage in tissue culture. In our study, we used an invasive strain to inoculate progesterone-pretreated normal mice and we started antichlamydial therapy 2 days pi. Although CaL-Dox was 2 fold more active on *C. trachomatis* *in vitro* than free Dox,¹² under our experimental conditions *in vivo*, bacteriological cure was not higher with 3 CaL-Dox, or 7 CaL-Dox than with 7 Dox. The high rates of positive cultures may have been due in part to the invasiveness of the chlamydial strain used. Despite the early commencement of all treatment regimens, antichlamydial antibody titers were detected from day 2 pi, and the geometric mean of antibody titers (GMT) remained high until weeks 7 (s7) and 8 (s8). Similar profile of high total serological antichlamydial antibody titers has been reported in women,²⁷ and in a mouse model of salpingitis infection with the mouse pneumonitis (MoPn) strain of *C. trachomatis*,²³ while they are under antichlamydial antibiotherapy. However, significantly lower GMTs were obtained with the 7 CaL-Dox treatment regimen. Likewise, ascending infections in the genital tract and their histopathological changes occurred less with 7 CaL-Dox than with all the other regimens: this drug formulation altered the rate of inflammation more than did the addition of antiinflammatory agents to tetracycline in the mouse model of salpingitis infection with *C. trachomatis* MoPn.²³ Empty CaL alone did not moderate the histopathological changes in infected mice, but the 3 CaL-Dox regimen had effects comparable to those of 7 Dox, and by increasing the dosage to 7 CaL-Dox, genital tract tissue were significantly more protected than with the 7 Dox regimen.

These results suggest that liposome-encapsulated Dox may have potential for the treatment of chlamydial infections. Further experimental antichlamydial therapies with other types of liposome-encapsulated antibiotics could be realized.

Acknowledgements

This work was supported in part by the "Programme Canadien des Bourses de la Francophonie" (PCBF) and in part by a grant from MRC/PMAC (Pfizer Canada Inc.).

L.S. is the recipient of a PCBF scholarship.

We thank Marie-Claude Guertin (Centre de Recherche, Hotel-Dieu-CHUM, Montreal) for her valuable assistance with the statistical analyses and Ovid Michael Da Silva for editing the manuscript.

References

1. Schachter, J. (1990). Chlamydial infections. *Western Journal of Medicine* **153**, 523-534.
2. Gerbase, A.C., Rowley, J.T. & Mertens, T.E. (1998). Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* **351**, Suppl. III 2-4.
3. Cates, Jr. W. & Wasserheit, J.N. (1991). Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **164**, 1771-1781.
4. Pearlman, M.D. & McNeeley, S.G. (1992). A review of the microbiology, immunology, and clinical implications of *Chlamydia trachomatis* infections. *Obstetrical and Gynecological Survey* **47**, 448-461.
5. Laga, M., Diallo, M.O. & Buve, A. (1994). Interrelationship of STD and HIV: where are we now? *AIDS* **8** Suppl. 119-124.
6. Toomey, K.E. & Barnes, R.C. (1990). Treatment of *Chlamydia trachomatis* genital infection. *Review of Infectious Diseases* **12** Suppl. 6 645-655.
7. Ridgway, G.L. (1997). Treatment of chlamydial genital infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 311-314.
8. Mourad, A., Sweet, R.L., Sugg, N. & Schachter, J. (1980). Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**, 696-698.
9. Jones, R.B., Van Der Pol, B., Martin, D.H. & Shepard, M.K. (1990). Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *Journal of Infectious Diseases* **162**, 1309-1315.

10. Lefèvre, J.C., Lepargneur, J.P., Guion, D. & Bei, S. (1997). Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Pathologie Biologie* **45**, 376-378.
11. Dessus-Babus, S., Bébéar, C.M., Charron, A., Bébéar, C. & De Barbeyrac, B. (1998). Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2474-2481.
12. Sangaré, L., Morisset, R. & Ravaoarinoro, M. (1999). In-vitro anti-chlamydial activities of free and liposomal tetracycline and doxycycline. *Journal of Medical Microbiology* **48**, 689-693.
13. Hildebrandt, J. (1986). Models of *Chlamydia* infections. In *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*, Volume 2, (Zak O & Sande MA. Eds), pp 275-295, Academic Press Inc., London.
14. Rank, R.G. (1994). Animal models for urogenital infections. *Methods in Enzymology* **235**, 83-93.
15. Ito, Jr.J.I., Lyons, J.M. & Airo-Brown, L.P. (1990). Variation in virulence among oculogenital serovars of *Chlamydia trachomatis* in experimental genital tract infection. *Infection and Immunity* **58**, 2021-2023.
16. Newhall, W.J., Batteiger, B. & Jones, R.B. (1982). Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* **38**, 1181-1189.
17. Sangaré, L., Morisset, R., Omri, A. & Ravaoarinoro, M. (1998). Incorporation rates, stabilities, cytotoxicities and release of liposomal tetracycline and doxycycline in human serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**, 831-834.
18. Stagg, A.J., Tuffrey, M., Woods, E., Wunderink, E. & Knight, S.C. (1998). Protection against ascending infection of the genital tract by *Chlamydia trachomatis* is associated with recruitment of major histocompatibility complex class II antigen-presenting cells into uterine tissue. *Infection and Immunity* **66**, 3535-3544.
19. Wang, S.-P. & Grayston, J.T.(1974). Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. *Journal of Infectious Diseases* **130**, 388-397.
20. Ito, Jr. J.I., Harrison, H.R., Alexander, E.R. & Billings, L.J. (1984). Establishment of genital tract infection in the CF-1 mouse by intravaginal inoculation of a human

- oculogenital isolate of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Infectious Diseases* **150**, 577-582.
21. Al-Awadhi, H., Stokes G.V. & Reich, M. (1992). Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in mouse fibroblasts by liposome-encapsulated tetracycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **30**, 303-311.
22. Beale, A.S. & Upshon, P.A. (1994). Characteristics of murine model of genital infection with *Chlamydia trachomatis* and effects of therapy with tetracyclines, amoxicillin-clavulanic acid, or azithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1937-1943.
23. Landers, D.V., Sung, M.L., Bottles, K. & Schachter, J. (1993). Does addition of anti-inflammatory agents to antimicrobial therapy reduce infertility after murine chlamydial salpingitis? *Sexually Transmitted Diseases* **20**, 121-125.
24. Swenson, C.E., Sung, M.L. & Schachter, J. (1986). The effect of tetracycline treatment on chlamydial salpingitis and subsequent infertility in the mouse. *Sexually Transmitted Diseases* **13**, 40-44.
25. Pal, S., Hui, W., Peterson, E.M. & De La Maza, L.M. (1998). Factors influencing the induction of infertility in a mouse model of *Chlamydia trachomatis* ascending genital tract infection. *Journal of Medical Microbiology* **47**, 599-605.
26. Jones, R.B., Katz, B.P., Van Der Pol, B., Caine, V.A., Batteiger, B.E. & Newhall, V.W.J. (1986). Effect of blind passage and multiple sampling on recovery of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **24**, 1029-1033.
27. Cunningham, D.S. (1995). Immune response characteristics in women with chlamydial genital tract infection. *Gynecologic and Obstetric Investigation* **39**, 54-59.

Table and figure legends

- Table I: Total serological antichlamydial antibody titers at various periods of sacrifice of positive control and treated mice
- Table II: Rates of pathological changes in various sites of the genital tracts of mice from positive control group and treatment regimens.
- Figure 1: Sections of mouse vagina

- Figure 2: Sections of mouse uterus
Figure 3: Sections of mouse oviduct
Figure 4: Sections of normal mouse ovary

Table I: Total serological antichlamydial antibody titers at various periods of sacrifice of positive control and treated mice

Périod of sacrifice	Total serum antichlamydial antibody titers				
	Pos Controls ^a	3 Dox ^b	3 CaL-Dox ^b	7 Dox ^b	7CaL-Dox ^b
s1	64 ^c (64) ^d	32 (32)	45 (16-64)	32 (16-64)	25 (16-32)
s2	36 (32-64)	58 (32-64)	128 (64-256)	78 (32-256)	24 (16-32)
s3	64 (64)	87 (64-256)	110 (64-128)	94 (32-256)	30 (16-128)
s4	54 (32-64)	188 (64-256)	138 (128-256)	99 (64-256)	51 (16-128)
s5	76 (64-128)	128 (32-256)	>181 (128- >512)	219 (64 - >512)	69 (16- >512)
s6	128 (64-256)	99 (64-256)	102 (64-128)	51 (32-64)	> 59 (16 - 512)
s7	64 (32-256)	90 (32-128)	120 (32-256)	56 (16-128)	36 (16-64)
s8	172 (64-512)	128 (64-256)	138 (64 - >512)	>48 (16 - >512)	37 (16-64)

^a Positive control mice injected with empty CaL

^b Treatment regimens: 3 doses of Dox (3 Dox) or CaL-Dox (3 CaL-Dox) and 7 doses of Dox (7 Dox) or CaL-Dox (7 CaL-Dox)

^c Lowest and highest total antichlamydial antibody titers

^d Geometric mean of antibody titers (GMT)

Table II: Rates of pathological changes in various sites of the genital tracts of mice from positive control group and treatment regimens

Groups/ Treatment regimens (nb tested)	Percentage (%) of pathological changes		
	Cervico-vaginal	Uterus	Fallopian tubes
-Positive controls (n = 39)	79.5	44.4	8.1
-3 Dox (n = 68)	81.0	30.3	7.3
-3 CaL-Dox (n = 69)	65.2	19.4	3.0
-7 Dox (n = 68)	47.1	9.1	4.4
-7 CaL-Dox (n = 70)	25.7	4.5	4.3

Figure 1: Sections of mouse vagina, hematoxylin and eosin stain. (A) Normal mucus-containing epithelial cells of vaginal-mucosa during diestrus in an uninfected animal in the 7 CaL-Dox group, at s4 (j24); magnification $\times 20$. (B) Abscess formation in mucus-containing epithelial cells of vagina during diestrus. Presence of cell debris, mononuclear and polymorphonuclear leukocytes in both abscess and vaginal lumen: chronic inflammation in 3 Dox animals at s7 (j45); magnification $\times 40$

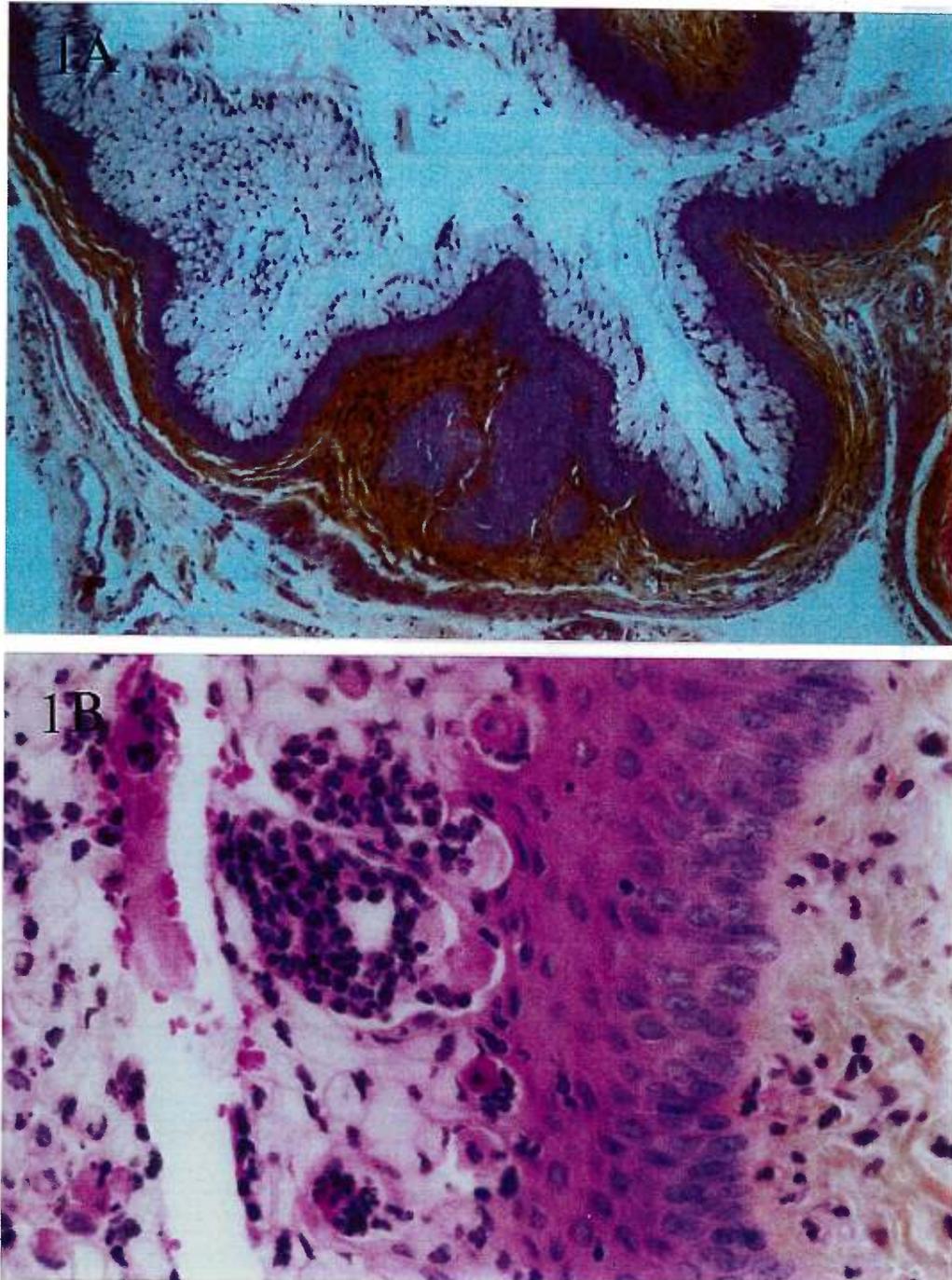


Figure 2: Sections of mouse uterus, hematoxylin and eosin stain. (A) Normal uterus in 7 CaL-Dox animals at s3 (j17); magnification $\times 20$. (B) Chronic infiltration of the uterine stroma in positive control animals at s4 (j24); magnification $\times 40$

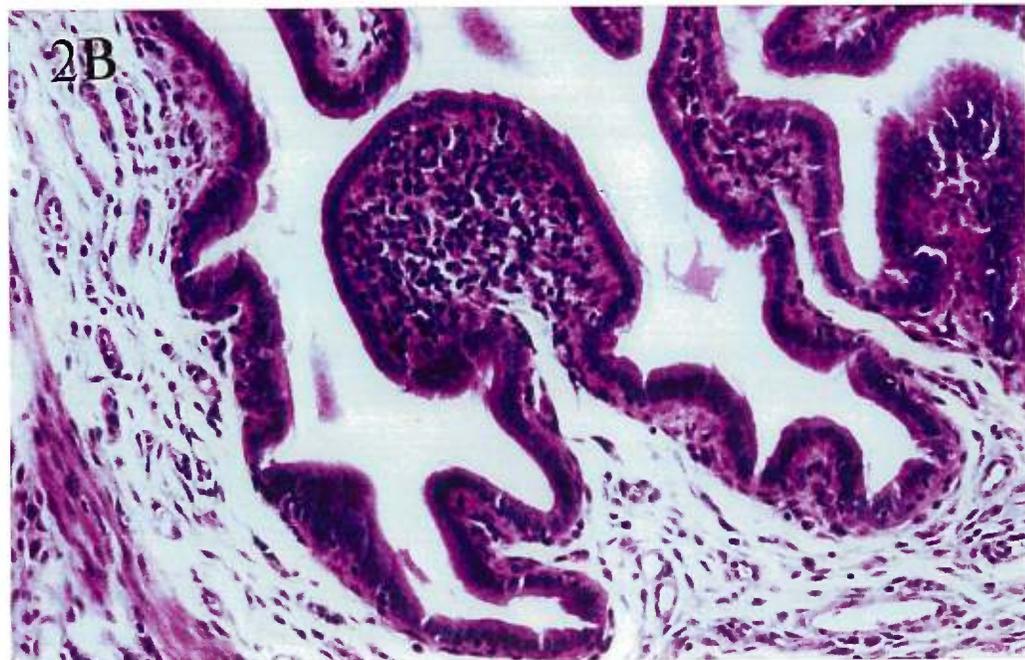
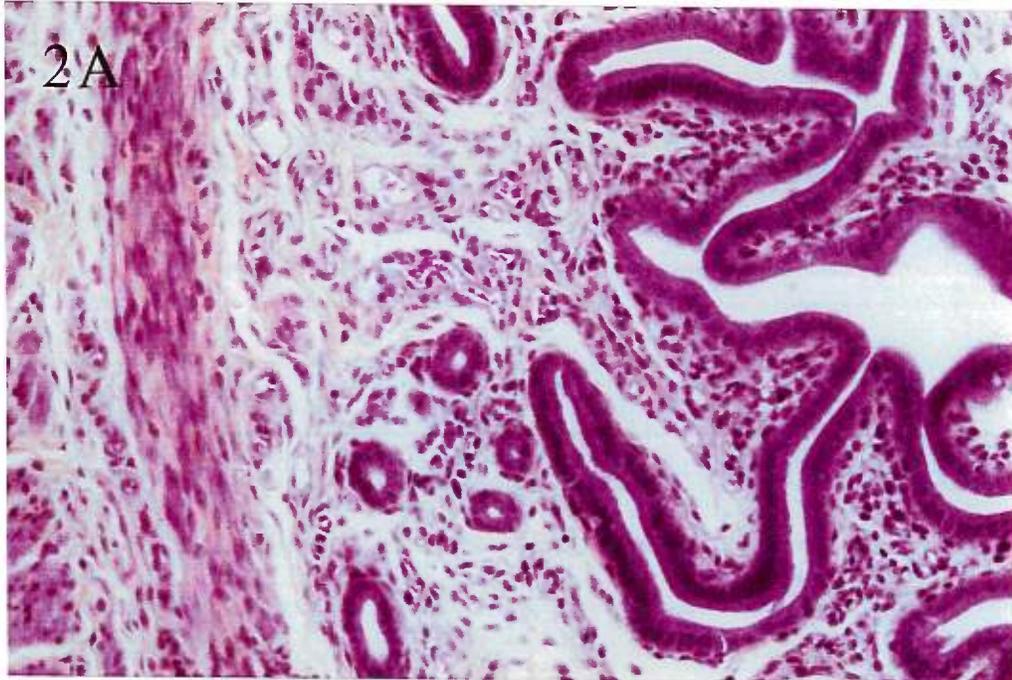


Figure 3: Sections of mouse oviduct, hematoxylin and eosin stain. (A) Normal oviduct in 3 CaL-Dox animals at s7 (j45); magnification $\times 20$. (B) Polymorphonuclear leukocytes in a dilated lumen of the oviduct and infiltrates in the layer of columnar cells: 3 Dox animals at s7 (j45); magnification $\times 40$

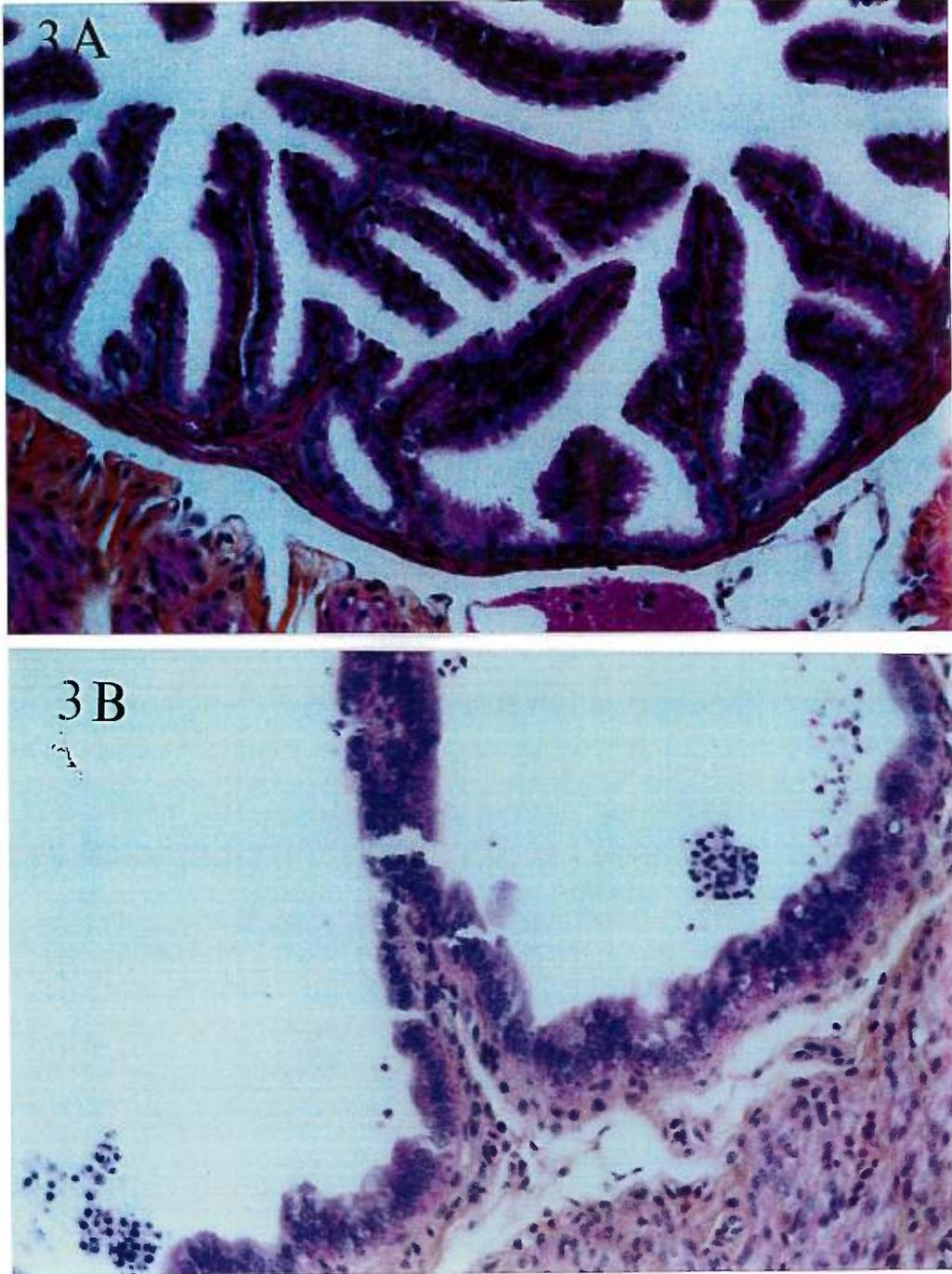


Figure 4: Sections of normal mouse ovary (hematoxylin and eosin stain, magnification $\times 10$)



TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

CHAPITRE 7 :DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis plusieurs décennies, le traitement curatif des infections génitales à *C. trachomatis* repose sur l'utilisation des tétracyclines et des macrolides; plus récemment, l'introduction des fluoroquinolones est venue élargir la gamme des antichlamydiens disponibles. Dans la famille des tétracyclines, la doxycycline administrée à 100 mg, 1 ou 2 fois par jour, par voie orale pendant 7 jours est préférée à la Tétracycline administrée à 500 mg × 4 / jour × 7 jours dans les infections aiguës de la partie basse de l'appareil génital. L'érythromycine est l'alternative la plus souvent prescrite (CDC, 1998; Ehret & Judson, 1993; Mardh & Löwing, 1990; Ridgway, 1997; Sanders et al., 1986; Toomey & Barnes, 1990; Weber & Johnson, 1995). Mais tous ces produits doivent être administrés pendant une durée minimale de 7 jours et les effets indésirables incommodes les patients au point de les porter à interrompre leur traitement. Des cas d'échecs thérapeutiques ont été rapportés tant dans des circonstances où les traitements n'ont pas été complétés tel qu'ils ont été prescrits, que chez des patients ayant rigoureusement observé leur traitement. Les traitements incomplets des infections ou à doses insuffisantes, favorisent l'émergence de résistance des agents infectieux aux antimicrobiens. Des souches cliniques de *C. trachomatis* résistantes à l'érythromycine, à la tétracycline ainsi qu'à la doxycycline, la minocycline et à la clindamycine ont été rapportés (Jones et al., 1990; Lefèvre et al., 1997; Mourad et al., 1980); cependant, leur importance clinique de même que leurs mécanismes moléculaires n'ont pas été établis.

Dans un grand nombre de cas d'infections urogénitales, *C. trachomatis* se trouve associée à d'autres agents de MST tels que *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* aux nombres desquels viennent s'ajouter des coliformes et d'autres bactéries anaérobies non sporulées, notamment dans les circonstances de PID. Les antibiotiques utilisés doivent alors couvrir ce spectre microbien et être administrés en doses suffisantes. L'utilisation de l'azithromycine en prise unique constitue une bonne alternative, dans la mesure où des études cliniques lui accordent une efficacité thérapeutique comparable à

celle de la doxycycline dans les infections monomicrobiennes non compliquées dues à *C. trachomatis* (Jones, 1991; Martin *et al.*, 1992; Ridgway, 1997; Stamm, 1991; Weber & Johnson, 1995); cependant, aucune étude ne rend compte de son efficacité à dose unique dans les infections urogénitales polymicrobiennes.

En attendant de pouvoir élucider la part réelle de l'interruption des traitements dans l'échec de la thérapie des infections urogénitales à *C. trachomatis* et la place véritable des résistances bactériennes observées avec certaines souches cliniques, des alternatives se dessinent à travers le développement de nouvelles molécules et les mises au point de formulations médicamenteuses à base de drogues déjà existantes. Il existe plusieurs systèmes de vectorisation des drogues dans les milieux cellulaires (Gupta *et al.*, 1993; Marchal-Heussler *et al.*, 1990; Puisieux & Poly, 1985), mais les liposomes constituent celui qui a trouvé le plus grand nombre d'applications en infectiologie. Les antimicrobiens encapsulés dans des liposomes ont été utilisés avec succès dans plusieurs cas d'infections expérimentales réalisées *in vitro* et *in vivo* (Lopez-Berestein, 1987; Bakker-Woundenberg & Lokerse, 1991; Karlowsky & Zhanel, 1992; Ravaoarino & Toma, 1993; Omri & Ravaoarino, 1998). À l'heure actuelle, les formulations liposomales de l'amikacine et de la nystatine sont en cours d'essais cliniques dans certains pays, tandis que l'amphotéricine B sous formes liposomales et d'émulsions lipidiques sont déjà disponibles dans le commerce, avec des efficacités thérapeutiques prouvées (Omri & Ravaoarino, 1998).

Plusieurs antichlamydiens ont pu être encapsulés dans des liposomes de compositions lipidiques diverses: Stuhne-Sekalec *et al.* (1991) ont montré que l'érythromycine et l'azithromycine étaient mieux incorporées dans des petits liposomes constitués de phosphatidylglycérol (PG) que dans ceux composés d'autres types de phospholipides. Toutefois, aucune étude subséquente portant sur leurs activités antimicrobiennes n'a été réalisée. Al-Awahdi *et al.*, (1992) ont encapsulé la tétracycline dans de petits liposomes chargés et neutres et ont montré que ces formulations liposomales avaient des activités antichlamydiennes supérieures à celle de l'antibiotique libre *in vitro*. Dans toutes ces deux études les taux d'encapsulation de la Tet ont été déterminés par des méthodes radiométriques et aucune évaluation de leurs activités antichlamydiennes n'a été réalisée *in vivo*.

Dans la présente étude, nous avons entrepris d'encapsuler dans différents types de liposomes, 3 antichlamydiens appartenant à la famille des macrolides et à celle des

tétracyclines: l'érythromycine, la tétracycline et la doxycycline. Dans une phase préliminaire, nous avons sélectionné parmi 2 méthodes de dosage communes aux 3 antibiotiques, celle qui présentait le plus d'avantages et le moins d'inconvénients en terme de réalisation, et qui fournissait le plus de précision dans la détermination des taux d'encapsulation dans les liposomes et des taux de recouvrement des antibiotiques utilisés: au regard des données disponibles dans la littérature, dès le départ nous avons retenu les tests microbiologiques et la chromatographie de haute performance en phase liquide (HPLC). Mais contrairement à la Tétracycline (Tet) et à la doxycycline (Dox) liposomales, nous avons rencontré des difficultés techniques dans l'utilisation de la méthode HPLC pour la détermination des taux d'encapsulation de l'érythromycine (Ery) et pour l'évaluation de la stabilité des formulations liposomales de l'antibiotique dans le sérum humain normal: il s'est agi notamment de difficultés d'adaptation des phases mobiles employées pour l'élution de l'Ery au système HPLC disponible (Données non publiées). Par ailleurs, les résultats obtenus avec les tests microbiologiques lors de l'évaluation de la stabilité des formulations liposomales de l'antibiotique dans le sérum humain normal n'étaient pas reproductibles (Sangaré *et al.*, 1997). Ces objections nous ont fait abandonner l'Ery pour la suite de l'étude. Pour les 2 antibiotiques restants, la détermination de leurs taux d'encapsulation dans les différents types de liposomes, les analyses des caractéristiques physico-chimiques et des activités antichlamydiennes *in vitro* de ces préparations liposomales devraient nous permettre de retenir une seule formulation liposomale d'un seul antibiotique pour l'évaluation de son efficacité thérapeutique dans un modèle animal d'infection génitale à *C. trachomatis*. Nous avons alors évalué les formulations liposomales de la Dox et de la Tet sur la base de (i) leurs taux d'encapsulation dans les différents types de liposomes, (ii) leur stabilité à 4°C pendant 4 semaines consécutives et dans le sérum humain normal pendant 72 h, (iii) leur toxicité sur les érythrocytes humains et les cultures de cellules HeLa 229 et enfin, (iv) de leurs activités antichlamydiennes *in vitro*.

(i) Par la méthode HPLC, les taux d'encapsulation de la Dox ont été de $28,6 \pm 6,4\%$, $49,1 \pm 6,7\%$ et de $21,0 \pm 0,8\%$ dans les liposomes cationiques (CaL), anioniques (AnL) et neutres (NtL) respectivement, alors qu'ils ont été de $3,5 \pm 0,3\%$ et de $2,2 \pm 0,6\%$ pour la Tet dans les AnL et NtL respectivement (Sangaré *et al.*, 1998). Par la méthode microbiologique, les taux d'encapsulation de la Dox dans les CaL, AnL et NtL ont été de

7,7±1,1 %, 64,8±6,4% et 19,3±1,7% respectivement, alors qu'ils ont été de 2,1±0,6 % pour la Tet dans les AnL. La Tet encapsulée dans les CaL-Tet n'a pu être détectée ni par la méthode microbiologique, ni par HPLC. Par ailleurs, l'antibiotique n'a pu être détecté par la méthode microbiologique dans les NtL-T (Sangaré et *al.*, 1997, 1998, 1999c). Ces taux d'encapsulation obtenus pour la Tet par les deux méthodes sont comparables à ceux rapportés dans l'étude de Al-Awadhi et *al.* (1992). Par la méthode HPLC, les efficacités de recouvrement de la Dox dans les préparations de CaL, AnL et NtL ont été 78,2%, 71,2% et 84,4% respectivement; les valeurs ont été de 94,1%, 110,5% et 94,5% respectivement avec la méthode microbiologique. Par la méthode HPLC, les efficacités de recouvrement de la Tet dans les CaL, AnL et NtL ont été de 94,1%, 75,5% et 80% respectivement; avec la méthode microbiologique, elles ont été de 86,6%, 88,8% et 89,4% respectivement dans les mêmes types de liposomes (Sangaré et *al.*, 1999c).

Seule la Tet encapsulée dans les CaL n'a pas pu être détectée par HPLC, alors qu'avec la méthode microbiologique l'antibiotique n'a été détecté ni dans les CaL, ni dans les NtL. Ces résultats pourraient traduire une sensibilité plus marquée de la méthode HPLC par rapport à la méthode microbiologique dans la détection de la Tet liposomale. Le taux d'encapsulation de la Dox dans les CaL établi par HPLC a été plus importante que celui déterminé par la méthode microbiologique; les valeurs étaient équivalentes avec les deux méthodes pour ses taux d'encapsulation dans les NtL. Par contre, les taux d'encapsulation de la Dox dans les AnL par la méthode microbiologique ont été significativement plus importants que ceux obtenus avec la méthode HPLC. Toutefois, au regard de l'efficacité de recouvrement de l'antibiotique dans cette préparation liposomale (110,5%), les taux d'encapsulation de la Dox dans les AnL pourraient avoir été surestimés. En effet, Ray et Newton (1991) ont montré que les activités antibactériennes de certaines tétracyclines déterminées par les tests microbiologiques peuvent être dues non seulement à ces antibiotiques eux-mêmes, mais aussi à leurs produits de dégradations dans les milieux réactionnels; cependant, ces produits de dégradations sont perceptibles sur les chromatographes par HPLC. Dans notre étude, les valeurs obtenues par la méthode microbiologique traduisaient non seulement les activités antibactériennes de l'antibiotique à doser, mais aussi celles des produits de dégradations générés aux différentes étapes de sa manipulation lors de la préparation des liposomes. Par contre, les taux que nous avons obtenus avec cette dernière méthode correspondaient spécifiquement aux seuls pics des antibiotiques à déterminer. Pour ces différentes raisons

auxquelles est venue s'ajouter la rapidité d'obtention des résultats, dans la suite de notre étude nous avons retenu la méthode HPLC pour tous les dosages d'antibiotiques liposomaux et la méthode microbiologique pour le contrôle de leurs activités antibactériennes effectives lorsque ceci a été nécessaire. Les préparations de CaL-Tet ont été soustraites de l'étude.

Les déterminations par HPLC, et même par la méthode microbiologique, ont montré que les taux d'encapsulation de la Dox étaient plus importants que ceux de la Tet dans tous les types de liposomes: cette différence pourrait s'expliquer par les distinctions entre certaines de leurs propriétés physico-chimiques dont la plus grande lipophilie de la Dox et sa plus grande stabilité en milieu aqueux que la Tet.

(ii) En dépit des avantages liés à l'utilisation des liposomes qui ont été rapportés par de nombreux auteurs, l'exploitation industrielle de ces vecteurs de médicaments à des fins thérapeutiques reste tout de même limitée. Plus de 30 ans après leur découverte, dans une ère où les possibilités biotechnologiques ont été poussées à leurs extrêmes limites, une seule formulation liposomale d'antimicrobien est disponible en clinique: l'Ambisome[®] qui est de l'amphotéricine B liposomale (Omri & Ravaoarino, 1998). L'une des principales raisons de cette limitation est l'instabilité des préparations liposomales lors de leur conservation en milieu aqueux. Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques dont les constituants sont susceptibles aux dégradations par de nombreux facteurs physico-chimiques (Betageri et al., 1993; Grit & Crommelin, 1993; Lang & Vigo-Pelfrey, 1993; Lichtenberg & Barenholz, 1988; Puisieux & Poly, 1985; Redziniak et al., 1995). Les produits résultant de telles dégradations peuvent être toxiques pour l'organisme qui les reçoit. En tant que vecteurs de médicaments, les liposomes doivent protéger la drogue encapsulée contre l'environnement biologique agressif du sujet auquel ils sont administrés. Cette exigence requiert une intégrité optimale des vésicules phospholipidiques lors de leur circulation dans les liquides biologiques et la libération de la drogue encapsulée dans des proportions suffisantes au niveau des sites d'action pour engendrer l'effet thérapeutique recherché. L'évaluation *in vitro* de ces propriétés pharmacocinétiques permettent aussi de prédire l'efficacité des formulations liposomales *in vivo* (Amselem et al., 1993; Benita & Devissaguet, 1985; Betageri et al., 1993).

Dans notre étude, la stabilité à 4°C pendant une durée minimale de 24 h était nécessaire pour les évaluations des activités antichlamydiennes *in vitro*; mais pour l'évaluation ultérieure des activités antichlamydiennes chez le modèle murin, ce temps minimal devrait s'étendre à une semaine. Nos études de stabilité des préparations liposomales conservées à 4°C pendant 4 semaines consécutives ont montré une plus grande stabilité des préparations liposomales de la Dox que celles de la Tet, notamment avec les CaL-Dox qui ont également présenté la meilleure stabilité dans le sérum humain pendant 72 h et une absence totale de toxicité vis à vis des érythrocytes humains normaux et des cellules HeLa 229 en culture pendant 72 h (Sangaré et *al.*, 1998). La stérilité des préparations liposomales est une caractéristique essentielle qui conditionne leur utilisation tant dans les modèles cellulaires *in vitro*, que chez les modèles expérimentaux animaux et chez l'homme. Cette stérilité a été contrôlée avant l'utilisation de chacune des préparations pour les différents tests: toute modification de résultats qui pourraient être liée à la croissance de bactéries contaminantes était à exclure (Sangaré et *al.*, 1998).

Les différents types de liposomes que nous avons utilisés ont incorporé plus de Dox que de Tet, et les formulations liposomales de Dox ont été plus stables que celles de la Tet lors de leur conservation à 4°C pendant 4 semaines. Plus particulièrement, les CaL-Dox ont été la formulation liposomale la plus stable dans le sérum humain normal à 37°C pendant 72 h d'incubation.

(iii) Les cellules HeLa 229 constituent une lignée continue de cellules cervicales humaines; cependant elles sont l'un des principaux types de cellules utilisées pour la culture et l'étude de la sensibilité des *Chlamydia* aux antibiotiques. Aussi, nous les avons préférées aux cellules leucémiques de souris (L1210) habituellement utilisées dans les évaluations de cytotoxicité des préparations liposomales (Parnham & Wetzig, 1993).

D'une manière générale, les formulations liposomales de Dox et les CaL-Dox en particulier, ont été moins toxiques que celles de la Tet tant pour les érythrocytes humains normaux que pour les cellules HeLa 229 (Sangaré et *al.*, 1998).

(iv) Plusieurs décennies après la réalisation des premières études de sensibilité des *Chlamydia* aux antibiotiques (Gordon & Quan, 1962, 1965; Kuo et *al.*, 1977; Ridgway et *al.*, 1976), et malgré l'énorme capital de connaissances accumulées sur la microbiologie de

ces pathogènes, à ce jour il n'existe toujours pas de méthodologie standard pour l'évaluation des activités des antibiotiques contre ces parasites intracellulaires obligatoires. Les variations méthodologiques portent sur toutes les étapes de l'analyse, celles-ci pouvant changer d'un laboratoire à un autre (Ehret & Judson, 1993).

Dans notre étude, nous avons utilisé la souche de référence *C. trachomatis* L₂/434/Bu du biovar LGV. La lignée cellulaire HeLa 229 (ATCC CCL 2.1) a été utilisée pour la préparation des inocula et la culture du micro-organisme. Nos paramètres d'analyse étaient comparables à ceux habituellement rapportés dans la littérature (Ehret & Judson, 1993; Sangaré et al., 1999a). Outre les CMI et CMB (CMB₁) classiquement déterminées dans les études de sensibilité des pathogènes aux antimicrobiens, nous avons déterminé une CMB₂ pour vérifier l'efficacité des concentrations bactéricides de ces antichlamydiens telles qu'elles ont été établies par les CMB₁.

Les valeurs de CMI et de CMB₁ obtenues pour la Tet et la Dox libres dans notre étude, étaient similaires à celles habituellement rapportées dans la littérature (Ehret & Judson, 1993). Les activités antichlamydiennes des formulations liposomales ont été plus importantes que celles des antibiotiques libres correspondants (Sangaré et al., 1999a; 1999b). Les AnL-Tet et AnL-Dox ont eu des activités inhibitrices plus marquées sur la croissance de *C. trachomatis* (CMI: 0,01µg/mL) que celles des autres formulations liposomales; cependant leurs activités bactéricides (CMB₁) ont été moins importantes que celles des CaL-Dox et NtL-Dox. Les déterminations de CMB₂ ont montré que la bactéricidie était incomplète aussi bien pour les antibiotiques libres que pour les NtL-Tet, CaL-Dox et AnL-Dox: pour ces antichlamydiens, les CMB₂ étaient supérieures aux CMB₁ et lorsqu'elles étaient égales comme c'était le cas pour la Tet et la Dox, les pourcentages d'inhibition de la croissance fournie par la CMB₂ étaient inférieurs à ceux des CMB₁. Dans de telles circonstances, l'augmentation relative des taux de cellules infectées pourrait être la manifestation d'une reprise de croissance des micro-organismes. Ces résultats traduisent des activités bactériostatiques. Pour les NtL-Dox et surtout pour les AnL-Tet, les valeurs des CMB₁ et CMB₂ étaient égales sans différences significatives dans les taux de cellules infectées à l'examen microscopique: ces résultats pourraient traduire des activités bactéricides (Sangaré et al., 1999b).

À ce jour, il n'a été fait état de résultats d'aucune étude de sensibilité de *C. trachomatis* à la Dox liposomale qui permettrait d'effectuer des analyses comparatives avec nos résultats.

L'étude préliminaire *in vitro* a permis de constater que:

1. la Dox était encapsulée dans tous les trois types de liposomes, non seulement à des taux détectables par chacune des deux méthodes de détermination à évaluer, mais surtout dans des proportions nettement supérieures à celles de la Tet dans les mêmes types de liposomes. Ces taux d'encapsulation élevés étaient d'autant plus importants qu'ils facilitaient le dosage des antichlamydiens à administrer aux modèles animaux d'infection.
2. les formulations liposomales de Dox étaient plus stables à 4°C que celles de la Tet. Certes, dans les délais de la réalisation des études de sensibilité *in vitro*, cette stabilité n'était affectée ni pour les formulations liposomales de la Tet, ni pour celles de la Dox: partant, elle n'avait aucune incidence sur la qualité des expériences à ce stade de nos travaux. Mais pour un plus long délai d'utilisation, notamment dans la perspective de leur administration à des souris infectées, il s'avérait important d'exclure toute altération des vésicules phospholipidiques ou de l'antibiotique en cours d'utilisation qui pourrait affecter la réponse au traitement du modèle expérimental. Cette autre exigence était à l'avantage des formulations liposomales de Dox.
3. les NtL-Tet et CaL-Dox ont été les 2 formulations liposomales les plus stables dans le sérum humain normal. Cependant, cette stabilité était beaucoup plus marquée pour les CaL-Dox, particulièrement au cours des premières 24 h d'incubation. L'importance de ce paramètre tient au fait que les vésicules phospholipidiques servant de vecteurs doivent résister aux facteurs sériques susceptibles de les dégrader afin d'améliorer la pénétration et l'accumulation de l'antibiotique véhiculé à des doses thérapeutiques dans les sites infectieux. Dans la perspective d'une réduction de la posologie, une bonne stabilité des liposomes dans le sérum constituait un avantage certain et celle-ci était plus favorable aux CaL-Dox qu'aux NtL-Tet et aux autres formulations liposomales.

4. aucune des 2 formulations liposomales de la Tet ne présentait une activité antichlamydienne particulièrement supérieure à celles de toutes les préparations liposomales de Dox.

Au regard de ces résultats nous avons préféré les formulations liposomales de la Dox à celles de la Tet pour la suite de l'étude. Et parmi les différents types de Dox liposomales, les CaL-Dox ont présenté le plus d'avantages elles ont été retenues pour l'évaluation de l'efficacité d'une formulation liposomale de l'antibiotique vs sa forme libre, dans le traitement expérimental d'une infection génitale à *C. trachomatis* chez le modèle murin.

Les systèmes cellulaires d'évaluation des activités des antichlamydiens fournissent des données qualitatives et quantitatives qui permettent d'anticiper l'incidence possible de l'utilisation des antimicrobiens dans l'infection chlamydienne. Cependant, l'efficacité d'un antimicrobien dans de tels systèmes ne garantit pas absolument son efficacité *in vivo*. La ciprofloxacine constitue un exemple éloquent: cet antibiotique est fortement chlamydiacide *in vitro*, mais il est cliniquement inefficace (Ridgway, 1997).

La pertinence de l'utilisation d'une formulation liposomale dans le traitement des infections chlamydiennes chez l'homme se justifie à bien d'égards: une plus importante activité antichlamydienne et la possibilité de réduction des doses et de la durée du traitement. Cependant, elle passe nécessairement par des essais cliniques dont l'une des étapes préliminaires consiste en son expérimentation chez un modèle animal.

Il existe plusieurs modèles animaux d'infections chlamydiennes expérimentales et d'évaluation des activités des antichlamydiens (Hildebrandt, 1986; Rank, 1994). Des singes mâles et femelles appartenant à diverses espèces ont servi de modèles dans de nombreuses études. Différentes souches oculo-génitales de *C. trachomatis* (sérotypes D, E, H, I et K) ont été utilisées pour produire des urétrites et des épидидymites expérimentales chez des babouins, des macaques et des marmousets (Hildebrandt, 1986; Monnickendam, 1988). Une étude menée par Quinn et *al.* (1986) a fait état de proctocolite expérimentale à *C. trachomatis* L₂ (SA-2f) chez des singes grivets. Des inoculations de souches oculogénitales humaines de *C. trachomatis* par voies intravaginales, intrautérines, intratubaires et par des

procédés d'autotransplantations de tissus d'endomètres ou de trompes infectées, ont également permis de produire des cervicites, des endométrites et des salpingites aux conséquences parfois infertilisantes chez des femelles de marmousets, de macaques, de singes grivets. Les modèles simiens ont aussi été pour des évaluations d'activités antichlamydiennes de plusieurs antibiotiques (Hildebrandt, 1986; Monnickendam, 1988; Patton et *al.*, 1992, 1993, 1994, 1997). Ils sont les plus proches des humains, mais leur taille et leur coût ne sont pas favorables à des études qui requièrent des grands nombres d'animaux. Les lapins (Patton et *al.*, 1982), les rats mâles et femelles (Jantos et *al.*, 1992; Kaushic et *al.*, 1998), et les cobayes (Hildebrandt, 1986; Monnickendam, 1988; Patton et *al.*, 1992; Rank, 1994; Rank & Sanders, 1992) ont aussi servi de modèles pour des études de pathogénie, d'immunologie et de traitements curatifs et préventifs dans des infections génitales à *C. trachomatis*. La souche de *C. psittaci* agent naturel de la conjonctivite du cobaye (GPIC: guinea pig inclusion conjunctivitis) est aussi responsable d'infections génitales et rectales chez cet animal: l'infection génitale de la femelle peut être transmise au mâle lors des accouplements et à la progéniture pendant que la femelle infectée met bas (Monnickendam, 1988). Bien que cette bactérie n'appartienne pas à l'espèce *C. trachomatis*, certains auteurs ont utilisé le système d'infection urogénitale "cobaye - *C. psittaci* GPIC" pour étudier la pathogénie des cystites, des cervicites, des endométrites et des salpingites ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte et l'antibiothérapie dans les infections à *C. trachomatis* (Hildebrandt, 1986; Monnickendam, 1988; Rank & Sanders, 1992). Toutefois, les infections génitales durables des cobayes et des rats femelles par des souches humaines de *C. trachomatis* ne peuvent être établies sans prétraitement des animaux avec la progestérone (Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981). Les traitements immunosuppresseurs de nature hormonale ou chimique contribuent à prolonger et à diffuser l'infection (Hildebrandt, 1986; Monnickendam, 1988; Rank, 1994). Mais, ni les lapins, ni les chats, ni les rats et ni les cobayes ne peuvent être manipulés en aussi grands nombres que les souris, ces derniers étant incontestablement les modèles expérimentaux les plus utilisés dans les études d'infections chlamydiennes. La souche *C. trachomatis* du biovar MoPn (pneumonie de la souris) infecte naturellement les souris chez lesquelles elle est aussi responsable d'infections génitales (Cotter et *al.*, 1997; Hildebrandt, 1986; Patton et *al.*, 1989; Rank, 1994) et d'arthrites (Monnickendam, 1988) sans que l'administration de progestérone soit nécessaire pour établir ces infections. À ces égards, ce modèle naturel a

été très utilisé dans des recherches qui auraient permis de mieux appréhender les mécanismes selon lesquels surviennent les salpingites (Rank, 1994), la stérilité subséquente (De La Maza et al., 1994; Khamesipour et al., 1994) et les facteurs qui influencent leur induction (Pal et al., 1998), la progression de l'infection dans des conditions d'immunodéficience de l'hôte (Cotter et al., 1997b; Su et al., 1997), la persistance du pathogène dans les tissus génitaux (Beale, 1997; Cotter et al., 1997a; Phillips & Burillo, 1998). Ce système aurait servi également pour l'évaluation de la nature de la réponse immunitaire de l'hôte (Cain & Rank, 1995; Kelly et al., 1996; Pal et al., 1993; Ramsey et al., 1989; Williams et al., 1997) et son implication dans les processus de prévention ou de résolution des infections génitales chlamydiennes (Igietseme et al., 1994; Pal S et al., 1997; Ramsey & Rank, 1991; Tseng & Rank, 1998) ainsi que pour l'évaluation de certains antibiotiques dans le traitement de ces infections (Beale & Upshon, 1994; Hildebrandt, 1986; Landers and al., 1993; Swenson et al., 1986). Très récemment, il a été utilisé pour étudier les infections génitales à *C. trachomatis* au cours de la grossesse (Pal et al., 1999). Tout ce potentiel fait du système constitué par les souris de diverses lignées et la souche *C. trachomatis* du biovar MoPn, un bon modèle pour les études des différents aspects des infections génitales chlamydiennes; cependant, aucun cas d'infection humaine par cette souche n'a encore été rapporté. De plus, le biovar MoPn a une position taxonomique controversée au sein de l'espèce *C. trachomatis* (Stephens, 1990). Les isolats oculogénitaux humains de *C. trachomatis* sont utilisés pour établir des infections génitales chez diverses souches de souris femelles; toutefois, autant que les femelles de rats et de cobayes, leur prétraitement par la progestérone est nécessaire (Hildebrandt, 1986; Rank, 1994; Tuffrey et al., 1981). Les premières ovulations spontanées chez la souris, surviennent 30 à 35 j (4 à 5 semaines) après la naissance et la durée totale du cycle ovarien normal est de 4 ou 5 j avec une phase folliculaire de 2 j et une phase lutéale de 2 ou 3 j (Donnelly & Hau, 1994; Tuffrey et al., 1981). En inoculant des souris CF-1 par voie vaginale à l'aide d'une souche du sérotype H de *C. trachomatis*, Ito et al. (1984) ont montré que l'infection ne pouvait être établie que pendant le métœstrus - 2, le dioœstrus et le pro-œstrus, trois étapes au cours desquelles les leucocytes sont abondants dans le vagin; cependant, ces infections réalisées même avec des inocula de titres très élevés ne duraient que 10 j au plus. Pendant les étapes d'oœstrus et de métœstrus - 1, les leucocytes étaient absents et l'infection ne pouvait être établie. L'infection des souris par des souches oculogénitales humaines est donc aisée au

cours de la phase lutéale et difficile au cours de la phase folliculaire: le cycle ovarien exercerait ainsi une influence sur le développement de l'infection chlamydienne chez les modèles murins (Pal et *al.*, 1998; Rank et *al.*, 1993; Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981) et cette influence manifestée par le biais des hormones de la reproduction a également été mise en évidence chez la femme (Washington et *al.*, 1990; Weström & Wölner-Hanssen, 1993). L'administration de progestérone permet de prolonger la phase lutéale et la présence des leucocytes dans le milieu vaginal, facilitant ainsi l'établissement de l'infection, prolongeant également sa durée et la rendant plus sévère (Ito et *al.*, 1990; Rank et *al.*, 1993; Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981). Tous le(s) mécanisme(s) précis selon lequel(s) la progestérone facilite l'infection des modèles murins par des sérotypes oculogénitaux humains de *C. trachomatis* ne sont pas bien connus, mais plusieurs auteurs pensent qu'elle agirait en exerçant un effet immunosuppresseur généralisé, en ramenant le cycle génital de l'animal aux étapes caractérisées par une cytologie vaginale propice (Ito et *al.*, 1984; Pal et *al.*, 1999; Rank et *al.*, 1993; Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981).

De nombreuses souches de souris immunocompétentes ou non, mais rendues sensibles par des prétraitements à la progestérone, ont servi à l'exploration de la pathogénie notamment dans les salpingites et l'infertilité (Hildebrandt, 1986; Ito et *al.*, 1984, 1990; Tuffrey et *al.*, 1982, 1986; Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981; Zana et *al.*, 1990), de la réponse immunitaire (Berry et *al.*, 1999; Johansson et *al.*, 1997; Stagg et *al.*, 1998; Starnbach et *al.*, 1995; Tuffrey et *al.*, 1984; Zhong & Brunham, 1992) et de l'antibiothérapie (Nakata et *al.*, 1992; Tuffrey et *al.*, 1991, 1994; Zana et *al.*, 1991) des infections provoquées par la quasi-totalité des sérotypes humains de *C. trachomatis*. Et dans un grand nombre de ces études réalisées à ce jour, les voies d'inoculations intrautérines et intratubaires utilisées étaient traumatisantes car relevant d'une microchirurgie, et elles étaient loin de représenter les conditions réelles de survenue des infections urogénitales chlamydiennes chez les humains (Beale & Upshon, 1994; Hildebrandt, 1986; Rank, 1994; Swenson et *al.*, 1983; Tuffrey et *al.*, 1982, 1986; Zana et *al.*, 1990). Il n'existe pas de modèle animal idéal, mais au regard du nombre indubitablement incomparable des études dans lesquelles les souris ont été utilisées avec ceux de l'ensemble des autres modèles animaux, les systèmes murins paraissent les plus importants: ils sont de moindre coût, procurent la possibilité de leur utilisation en plus grand nombre et la production de lésions génitales semblables à celles qui surviennent chez les humains.

Ito et al. (1984; 1990) ont établi des infections génitales expérimentales par voie vaginale chez des souris CF-1, en utilisant diverses souches oculogénitales de *C. trachomatis*; mais ces auteurs n'ont pas décrit de lésions histopathologiques inhérentes à l'infection au cours de leurs travaux. Par ailleurs, aucune des études dont les résultats sont disponibles dans la littérature ne fait état d'une infection expérimentale de cette lignée de souris par une souche chlamydiennne appartenant au biovar LGV. Dans la phase préliminaire de notre étude, nous avons évalué la susceptibilité de 60 souris CF-1 femelles à l'infection par *C. trachomatis* L₂/434/Bu, au traitement par la Dox sous forme libre et par les liposomes cationiques vides (CaL-vides). Ces souris étaient âgées de 31 à 36 j à leur réception dans notre laboratoire et elles pesaient en moyenne 21,7±0,3 g au moment de leur premier traitement par la progestérone. Les résultats obtenus ont permis de déterminer la durée moyenne de l'infection qui était supérieure à 60 jours et d'établir l'absence de toxicité de l'antibiotique ainsi que leur tolérance des liposomes aux doses requises pour notre étude. L'infection chlamydiennne ainsi établie pouvait induire une réponse immune caractérisable par des tests sérologiques et des lésions tissulaires au niveau de l'appareil génital qui étaient semblables à celles rencontrées chez la femme. Nous avons démontré pour la première fois, que l'infection par voie vaginale du tractus génital des souris CF-1 prétraitées par la progestérone pouvaient être établie de manière durable avec la souche de *C. trachomatis* L₂/434/Bu et que ce système ne pouvait être considéré comme un modèle des voies génitales basses seulement (résultats non publiés). Au regard de ces différents résultats, nous avons retenu ces souris comme modèles animaux dans l'évaluation du traitement expérimental de l'infection génitale à *C. trachomatis* L₂/434/Bu par la Dox sous formes libre et encapsulée dans les CaL. L'étude préliminaire nous avait permis de démontrer que les CaL-Dox avaient une activité inhibitrice de la croissance chlamydiennne *in vitro* 2 fois supérieure à celle de la Dox libre (Sangaré et al., 1999a, 1999b). Sur cette base, nous avons défini 4 groupes de traitement pour évaluer notamment l'incidence de la réduction de la dose totale de la formulation liposomale sur le traitement de l'infection chlamydiennne dans notre système expérimental animal. Chacun des groupes comptaient 70 souris: le groupe traité avec 3 doses (3 Dox) et 7 doses (7 Dox) de Dox libre et les groupes traités avec 3 doses (3 CaL-Dox) et 7 doses de CaL-Dox (7 CaL-Dox). À ces 4 groupes définissant les 4 régimes de traitement, nous avons associé 2 groupes témoins: un groupe de 40 souris infectées et traitées par des CaL-vides (témoins positifs) et un groupe de 20 souris non

infectées auxquelles nous avons administré de l'eau injectable (témoins négatifs). L'utilisation de tels effectifs d'animaux a été justifiée par les analyses statistiques préalables réalisées par le Groupe COREV (Outremont, Canada). Les 4 régimes de traitement par la Dox libre et les CaL-Dox ainsi établis permettraient de comparer statistiquement:

- l'effet général des antichlamydiens, toutes formulations et toutes doses confondues, sur le cours de l'infection (effet des traitements),
- l'efficacité des CaL-Dox à celle de la Dox libre dans le traitement de l'infection génitale (effet de la formulation de l'antibiotique),
- les différences d'efficacités entre les 3 et 7 doses d'antichlamydiens (effets des doses administrées),
- ainsi que les régimes de traitement qui combinent les formulations et les doses (effet des régimes).

Les efficacités des traitements et le cours de l'infection chlamyidienne ont été suivis par la culture des écouvillonnages vaginaux, l'histologie des appareils génitaux et le titrage des Ac sériques totaux (IgM, IgA et IgG) anti *-C. trachomatis* dans tous les groupes de souris ayant reçu des antichlamydiens et chez les témoins.

En plus de la progestérone, du statut hormonal et des voies d'inoculations, plusieurs études ont démontré que l'implantation et l'évolution de l'infection génitale par des isolats oculogénitaux humains de *C. trachomatis* chez la souris peuvent être influencées par divers autres facteurs: la lignée de la souris elle-même (Stagg and *al.*, 1998; Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981; Tuffrey et *al.*, 1986; Zhong & Brunham, 1992), son statut immunitaire (Johansson et *al.*, 1997; Tuffrey et *al.*, 1982), la taille de l'inoculum (Ito et *al.*, 1984), ainsi que la virulence de la souche chlamyidienne utilisée (Ito et *al.*, 1990; Tuffrey et *al.*, 1986; Tuffrey & Taylor-Robinson, 1981). Selon la susceptibilité de l'hôte, l'infection génitale par *C. trachomatis* chez la souris peut avorter ou devenir inapparente, même en l'absence d'antibiothérapie: la quasi-totalité des infections expérimentales l'attestent et le pathogène n'est pas détecté par la culture dans de telles circonstances (De La Maza et *al.*, 1994; Ito Jr et *al.*, 1984, 1990; Swenson et *al.*, 1983; Zana et *al.*, 1990). Et même sous traitement l'obtention de telles clairances ne traduit pas toujours une guérison bactériologique: les antimicrobiens, de par leur nature ou leurs doses insuffisantes, peuvent favoriser cette dissimulation du pathogène. La présence prolongée de *C. trachomatis* dans les organismes vivants humains ou animaux peut provoquer des dommages tissulaires irréversibles, que le

pathogène soit détectable par la culture, qu'il soit sous forme cryptique non cultivable ou encore sous formes d'antigènes dont certains peuvent provenir de l'action des antimicrobiens (Beatty et *al.*, 1994; Cerin et *al.*, 1991; Moulder, 1991; Wyrick et *al.*, 1999; Zana et *al.*, 1990). Lorsque la culture est négative, les preuves de la présence des formes cryptiques viables peuvent être apportées par la détection des ARN du micro-organisme chez le sujet infecté (Beutler et *al.*, 1995; Black, 1997; Cheema et *al.*, 1991; Holland et *al.*, 1992; Morré et *al.*, 1998b). Plusieurs travaux ont montré que les infections chlamydiennes inapparentes donnant des résultats négatifs à la culture, pouvaient être réactivées par l'administration d'immunosuppresseurs, et produire des corps chlamydiens détectables par la culture (Cotter et *al.*, 1997a; Malinverni et *al.*, 1995; Yang et *al.*, 1983). Dans notre étude, l'administration de cortisone aux souris avant leur sacrifice à la période s8 avait pour but d'induire une immunodépression dont la conséquence serait de faciliter la culture de corps chlamydiens avec les 5 passages aveugles des écouvillonnages vaginaux. Éventuellement, si les résultats de la culture ne s'avéraient pas concluants, une analyse plus poussée reposant sur la détection des ARNr 16S selon la méthode décrite par An et *al.* (1992) ou de l'ARNm du Dna-K chlamydiens inspirée de la méthode décrite par Khan et *al.* (1996) devrait être réalisée.

Les résultats obtenus ont montré que le taux de cultures positives étaient 2 fois inférieurs chez les souris traitées avec les antichlamydiens (40,6%; 113/278) que chez les témoins positifs (82 %; 32/39), et cet effet du traitement était statistiquement significatif ($P: 0,001$). La culture n'a pu être effectuée pour 3 souris. Les analyses statistiques ont montré également que les taux de cultures positives chez les souris traitées avec les CaL-Dox (36 %; 50/139) et chez celles qui avaient reçu la Dox (45,3 %; 63/139) étaient comparables ($P: 0,112$), indiquant ainsi l'absence de différence statistiquement significative liée à la seule formulation des antichlamydiens administrés. Lorsque nous avons comparé les résultats obtenus selon les doses d'antichlamydiens administrés sans distinction de formulation, les taux de cultures positives chez les souris qui avaient reçu 3 doses (56,8 %; 79/139) étaient plus de 2 fois supérieurs à ceux des souris qui en avaient reçu 7 (24,5 %; 34/139): cet effet de la dose sur les résultats de la culture était statistiquement significatif ($P: 0,001$). La culture était positive pour 61,4 % (43/70) des souris du régime de 3 Dox, pour 52,1 % (36/69) de celles de 3 CaL-Dox, pour 29 % (20/69) de celles de 7 Dox et pour

20 % (14/70) de celles de 7 doses de CaL-Dox. À l'exception du régime de 3 Dox, le taux de cultures positives observé pour chacun des régimes de traitement était statistiquement plus faible que celui des témoins positifs ($P: 0,001$). Les taux observés avec les régimes de 7 Dox (29 %) et de 7 CaL-Dox (20 %) étaient comparables ($P > 0,05$) et tous les 2 avaient des taux statistiquement plus faibles que ceux obtenus avec chacun des 2 autres régimes de 3 doses, montrant ainsi que l'effet de l'augmentation de la dose était indépendant de la formulation de l'antibiotique.

La culture a été réalisée pour chaque écouvillonnage vaginal recueilli chez les animaux lors des 8 périodes de sacrifice. Les cultures étaient positives à la période s1 (2 j post-inoculation: j2 p-i) pour toutes les souris inoculées et elles sont restées positives jusqu'à période s 8 (j55 p-i) chez la majorité des souris du groupe des témoins positifs. Dans les modèles expérimentaux murins d'infections génitales chlamydiennes, lorsque les animaux ne sont pas prétraités avec la progestérone, leur inoculation par voie vaginale au moment propice permet également de détecter les inclusions chlamydiennes dans les cultures d'écouvillonnages vaginaux recueillis dans la première semaine (Blander & Amortegui, 1994; Pal et al., 1998; Ito et al., 1984); mais généralement, ces infections sont autolimitatives et la clairance bactériologique survient quelques jours à quelques semaines (4 semaines) p-i (Barron et al., 1981; Blander & Amortegui, 1994; De La Maza et al., 1994; Ito et al., 1984; Rank & Sanders, 1992). Par contre, lorsque ces animaux sont prétraités avec la progestérone, non seulement les taux de cultures positives augmentent, mais le cours de l'infection est également prolongé, parfois à plus de 9 semaines p-i (Blander & Amortegui, 1994; Ito et al., 1990; Johanson et al., 1997).

Dans notre étude, les cultures sont restées positives à la période s2 (j 2 post-traitement: j 2 p-t ou j 10 p-i) chez la totalité des souris du groupe des témoins positifs et chez celles soumises aux régimes de 3 Dox et de 3 CaL-dox. À cette même période s2, la culture était positive chez 85,7 % des animaux du régime de 7 Dox et chez 42,8 % de ceux du régime de 7 CaL-Dox. Les taux de cultures positives sont restés élevés jusqu'à la période s8 (j55 p-i) chez les témoins positifs et les animaux des régimes de 3 doses d'antichlamydiens. Cependant, avec les régimes de 7 doses d'antichlamydiens, le cours de l'infection avait des profils différents. Son allure était biphasique chez les souris soumises au régime de 7 Dox: les cultures étaient restées négatives aux périodes s3 (j17 p-i) et s4 (j24 p-i), avant que le pathogène ne soit détecté de nouveau de s5 (j31 p-i) à s8. Chez les animaux du régime des

7 CaL-Dox, la négativation des cultures d'écouvillonnages vaginaux a été progressive, les taux passant de 42,8% (s2) à 22,2 % à s3 puis à 10% à s8.

Pour déterminer l'influence de la période de sacrifice sur les résultats de la culture, nous avons regroupé les périodes de sacrifice en 2 sous-périodes, l'une allant de s1 à s5 et l'autre de s6 (j38 p-i) à s8. La comparaison des résultats de ces 2 sous-périodes a montré que les taux de cultures positives dans la sous-période s1 à s5 étaient significativement plus élevés que dans la sous-période s6 à s8 pour l'ensemble des souris examinées ($P: 0,005$), et cette tendance était homogène dans chaque groupe de traitement. L'effet de la période étant ressenti de manière identique dans chaque groupe, aucun biais lié à ce facteur ne pouvait influencer les résultats obtenus avec l'un quelconque de régimes de traitement. Les différences observées entre les régimes de traitement étaient liées aux traitements par les antichlamydiens. Par ailleurs, ces résultats nous ont permis de constater que la période optimale pour la réalisation des cultures de contrôle de la cure bactériologique des infections chlamydiennes pourrait se situer au-delà de 5, voire 7 semaines après l'arrêt d'un traitement bien suivi.

Jones et *al.* (1986) ont montré que la sensibilité de la culture pour la détection des *Chlamydia* dans les échantillons cliniques pouvait être augmentée par des séries de passages aveugles et des prélèvements multi-sites. Nakata et *al.* (1992) ont effectué 5 passages aveugles en milieu de culture cellulaire sans antibiotique pour déterminer les CMB de certaines tétracyclines et quinolones sur une souche de *C. trachomatis*. En évoquant la nécessité de standardiser les méthodes d'étude de sensibilité des *C. trachomatis* aux antibiotiques, Ridgway et *al.* (1976) avaient déjà souligné l'importance d'effectuer 10 passages aveugles avant d'établir l'activité antichlamydienne d'une drogue. Mais dans la quasi-totalité des études épidémiologiques ou de diagnostic (Black, 1997; Mercer et *al.*, 1990; Theunissen et *al.*, 1994) et celles portant sur la persistance à l'absence de traitement ou en période post-thérapeutique (Beale, 1997; Cerin et *al.*, 1991; Cotter et *al.*, 1997a; Morré et *al.*, 1998b; Thejls et *al.*, 1991), les résultats sont exprimés sur la base d'une seule culture. Les corps chlamydiens viables, mais non cultivables dans ces conditions et dont la présence peut être déterminée par des techniques moléculaires (Black, 1997; Mercer et *al.*, 1990; Morré et *al.*, 1998b; Thejls et *al.*, 1991; Theunissen et *al.*, 1994), deviendraient alors détectables au terme de plusieurs passages aveugles en milieu sans antibiotique. Il y a donc lieu de penser que les résultats véritables de bon nombre de ces études épidémiologiques,

de diagnostic et de persistance ainsi que la sensibilité des méthodes de culture elle-même seraient sous-estimés: les déterminations de CMB₁ et de CMB₂ dans notre étude préliminaire *in vitro* (Sangaré et al., 1999a, 1999b) nous ont permis de vérifier cette assertion et d'y apporter des preuves. Aussi, pour nos expériences *in vivo*, nous avons réalisé 5 passages consécutifs pour chaque écouvillonnage vaginal. De plus, nous avons administré de la cortisone aux dernières souris de chaque groupe, avant leur sacrifice à la période s8: les injections de cortisone avaient pour but de réduire les défenses immunitaires des animaux infectés et de faciliter la culture des micro-organismes qui auraient survécu aux différentes antibiothérapies. Les résultats obtenus entre les 2 formulations de l'antibiotique après administration de la cortisone, ont montré que le nombre de cultures positives dans le groupe de 3 Dox (7/10) était comparable à celui des 3 CaL-Dox (5/10) tout comme ceux des 7 Dox (3/10) et des 7 CaL-Dox (1/10). Cette absence de différence statistiquement significative ($P > 0,05$) n'a pas rendu nécessaire la détection d'ARN chlamydiens par RT-PCR qui est une méthode jugée habituellement plus sensible que la culture.

L'ensemble des analyses portées sur ces différents résultats a montré que les régimes de 7 doses étaient plus efficaces que ceux des 3 dans le traitement des infections génitales chlamydiennes chez les femelles de souris CF-1. Par contre, ni les 3 doses, ni les 7 doses de CaL-Dox n'ont permis des cures bactériologiques supérieures à celle des 7 doses de Dox libre.

Les examens histologiques ont porté sur des coupes transversales réalisées aux niveaux de la partie cervico-vaginale, de l'utérus, des 2 trompes et des deux ovaires colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Différents types de réactions histopathologiques ont été observés: des infiltrations de leucocytes polynucléaires (inflammations aiguës) ou de mononucléaires de types lymphocytes ou monocytes/ macrophages (inflammations chroniques), des abcès, des fibroses non physiologiques, des érosions épithéliales et des dilatations d'oviductes. Aucune de ces formes d'anomalies n'a été observée dans le groupe de souris témoins négatifs, alors que dans tous les groupes de souris infectées, qu'elles aient été traitées ou non, les examens histologiques ont révélé l'existence d'inflammations sous divers aspects. Des exemples d'atteintes tissulaires sont illustrés dans les figures de l'Article IV. Ces réactions histopathologiques ont affecté toutes les parties de l'appareil génital, à l'exception des ovaires. La majorité des cas d'inflammations ovariennes rapportés dans la

littérature est survenue à la suite d'inoculation directe des micro-organismes dans les bourses ovariennes des animaux. Dans les cas d'infections génitales établies par les voies naturelles et rapportés dans la littérature, il n'est presque jamais fait cas des atteintes ovariennes: les cas décrits chez des souris MF-1 (Beale & Upshon, 1997) et BALB/c (Blander & Amortegui, 1994) infectées par des souches du biovar MoPn de *C. trachomatis*, font partie des très rares cas ayant fait suite à des inoculations par voie vaginale.

Dans notre étude, les examens histologiques n'ont pas été effectués chez 6 souris. En confondant les résultats de toutes les parties du tractus génital qui ont été examinées, des inflammations ont été constatées chez 54,5 % (150/275) des souris qui ont reçu une antibiothérapie contre 79,5 % (31/39) chez les souris témoins positifs: les tissus génitaux des souris traitées par les antichlamydiens, sans distinction de formulations ou de doses, ont été moins affectés que ceux des témoins positifs et cette différence liée au traitement a été statistiquement significative ($P: 0,003$). Sans tenir compte des doses administrées, la proportion des souris traitées et qui ont présenté au moins une réaction histopathologique au niveau de l'une quelconque des parties de l'appareil génital a été plus élevée chez celles qui ont reçu la Dox (64 %; 87/136) que chez celles qui ont été traitées avec les CaL-Dox (45,3 %; 63/139): cette différence liée à la formulation de l'antibiotique a été statistiquement significative ($P: 0,002$). Le taux de lésions histopathologiques a été 2 fois plus important chez les souris traitées avec 3 doses d'antichlamydiens (73 %; 100/137), sans distinction de formulation, que chez celles qui en ont reçu 7 (36,2 %; 50/138): cette différence liée à la dose a été statistiquement significative également ($P: 0,001$). Ainsi, l'administration de l'antibiotique sous sa formulation liposomale et en 7 doses a entraîné une diminution significative de la réponse inflammatoire: les comparaisons des taux de réactions inflammatoires dans les 4 régimes de traitement ont montré l'existence de différences significatives entre le groupe des 7 doses de CaL-Dox et tous les autres de traitement ($P < 0,05$): le taux était nettement plus faible dans ce groupe et les lésions étaient moins étendues. Par contre, il n'y avait pas de différences significatives entre le régime de 3 CaL-Dox et celui de 7 Dox.

Le principe de la progression ascendante de l'infection chlamydienne dans le tractus génital féminin est acquis depuis de longue date: les lésions endométriales et tubaires apparaissent

après celles de la partie cervico-vaginale. Mais seules quelques études comme celle de Pal et al. (1998) ont fait état de la chronologie de cette progression. Dans notre étude, 83,3 % des souris témoins positifs ont développé des lésions cervico-vaginales, 44,4 % ont développé des endométrites et 8,1 % des salpingites pendant la durée totale de l'étude. Ce type de gradient a été observé chez les souris soumises aux régimes de 3 Dox (79,4 % de cervico-vaginites, 30,3 % d'endométrites et 7,3 % de salpingites), de 3 CaL-Dox (65,7 % de cervico-vaginites, 19,4 % d'endométrites et 7,3 % de salpingites) et de 7 Dox (47,8 % de cervico-vaginites, 9,1 % d'endométrites et 4,4 % de salpingites). Avec le régime de 7 CaL-Dox, 26,1 % de cervico-vaginites ont été observés et les taux d'endométrites et de salpingites étaient semblables (4,5 %). Les réactions histopathologiques ont été observées au niveau cervico-vaginal chez des souris de tous les régimes de traitement et chez les témoins positifs, à toutes les 8 périodes de sacrifices. Les endométrites ont également été observées à toutes ces périodes, dans les 2 régimes de 3 doses d'antichlamydiens comme dans le groupe de témoins positifs; elles ont été détectées plus tardivement avec les régimes de 7 CaL-Dox (s7 et s8) et de 7 Dox (s6 à s8). Les salpingites uni ou bilatérales sont apparues dès la période de sacrifice s1 chez les témoins positifs: des résultats similaires ont été rapportés chez des souris et des cobayes infectées par voie vaginale avec des souches du biovar MoPn de *C. trachomatis* et GPIC de *C. psittaci* respectivement (Beale, 1997; Pal et al., 1998; Rank & Sanders, 1992; Rank et al., 1993). Les lésions des trompes ont été observées dès la période s2 chez les souris du régime de 3 Dox, alors que leur apparition a été plus tardive chez celles des régimes de 3 CaL-Dox (s6), de 7 Dox (s6) et de 7 CaL-Dox (s7). Tous les cas de salpingites observés chez les souris traitées avec les CaL-vides (témoins positifs) étaient associés à des cultures positives contre 2 sur 4 cas pour les 3 Dox, 1 sur 2 cas pour les 3 CaL-Dox, et 1 sur 3 cas pour les 7 Dox. La seule souris ayant présenté une salpingite chez les souris soumises au régime de 7 CaL-Dox avait une culture négative. Il a été démontré dans plusieurs modèles animaux d'infections chlamydiennes expérimentales que les réactions histopathologiques des parties supérieures du tractus génital qui sont associées à des cultures positives d'échantillons vaginaux sont généralement dues à la présence du micro-organisme en ces sites: et la présence de micro-organismes viables a été prouvée par des cultures d'échantillons provenant de ces sites. Dans notre étude, les endométrites et les salpingites observées chez les témoins positifs devraient avoir été causées par les micro-organismes viables arrivés à ces sites selon un

processus de progression ascendante. Mais chez les souris traitées, le micro-organisme n'a été identifié par la culture que dans 4 des 10 cas de salpingites. Cinq de ces 10 cas ont été observés après administration de la cortisone et une seule culture positive a été observée parmi les 5 cas. Dans les cas où la culture a été négative, l'éventualité d'une inflammation des oviductes due à la présence de corps chlamydiens viables n'est pas à exclure totalement, particulièrement chez les souris des régimes de 3 doses d'antibiotique pour lesquelles l'antibiothérapie aura été insuffisante. Toutefois pour les régimes de 7 doses, ces manifestations inflammatoires pourraient être dues non pas à des corps bactériens viables, mais à la persistance dans les tissus infectés, d'antigènes résiduels émanant de la destruction des corps chlamydiens par les drogues administrées. L'existence de telles sources d'inflammations prolongées post-thérapeutiques a été mise en évidence par Cerin et *al.*, (1991) et par Wyrick et *al.* (1999). Avec le régime de 7 doses de CaL-Dox, le seul cas d'inflammation des oviductes est survenu à s7 et il était associé à une culture négative.

Ces différents résultats ont attesté d'une meilleure efficacité du régime de 7 doses de CaL-Dox dans la préservation de l'intégrité des tissus contre les dommages inflammatoires.

À l'image des réponses sérologiques observées chez les humains atteints d'infections génitales chlamydiennes, l'inoculation des souris par voie vaginale a induit une production d'anticorps anti-*Chlamydia*. L'infection génitale étant généralement asymptomatique, l'infection aiguë passe inaperçue et la détection des IgM n'est généralement pas concluante (Black, 1997). Les Ac locaux de type Ig A sont parfois déterminés dans les sécrétions vaginales, mais ce sont surtout les Ac sériques anti-*Chlamydia* de la classe des IgG qui sont les plus couramment détectés en clinique (Black, 1997; Numazaki, 1998). Il existe plusieurs méthodes de détection et de titrage des Ac sériques anti-*Chlamydia* (Black, 1997), toutefois dans notre étude, nous avons développé une technique de micro-IF issue de la modification de la méthode de référence décrite par Wang et Grayston (1974). Pour ce faire, les corps élémentaires (CE) chlamydiens qui ont servi d'antigènes ont été produits en culture cellulaire et pour atteindre le titre requis ($> 10^9$ CE/mL), nous avons réalisé des concentrations de suspensions de CE par centrifugations successives à partir des aliquots déjà existants: la suspension finale a été faite dans du

tampon phosphate salin, 0,01 M tampon PBS, pH 7,0. Afin de faciliter l'adhérence des antigènes à la surface des lames, nous avons mélangé à volume égal, la suspension antigénique pure avec le surnageant de centrifugation ($500 \times g$ pendant 10 mn à la température ambiante) d'une suspension de poudre de jaune d'oeuf de poule à 3% dans du 0,01M PBS pH 7,0. Le sérum témoin positif utilisé provenait d'une souris infectée par *C. trachomatis* L₂/434/Bu lors de l'étude expérimentale *in vivo*: et le témoin négatif provenait de souris indemne d'infection chlamydienne par la culture, l'histologie et la sérologie. Les qualités des sérums ont été confirmées par immunoblot selon une modification de la méthode de Newhall et *al.* (1982) (résultats non publiés).

Les résultats du titrage ont montré que 9 des 20 souris du groupe de témoins négatifs (non infectées) avaient des titres d'anticorps de 1:8: nous avons alors considéré comme positif tout sérum dont le titre était $\geq 1:16$. Le titrage des Ac n'a pu être effectué chez 5 des souris. Dans l'ensemble, 92% (254/276) des souris soumises aux 4 régimes de traitement et 100% (39/39) de celles du groupe des témoins positifs avaient une sérologie chlamydienne positive: l'analyse de l'effet du traitement sur la sérologie a montré que ces résultats étaient comparables ($P: 0,068$). Cunningham (1995) a montré que chez les patientes souffrant d'infections génitales chlamydiennes, les titres des IgG plasmatiques anti-*Chlamydia* étaient comparables entre celles qui avaient été bactériologiquement guéries de leur infection et celles chez lesquelles la guérison n'avait pas été obtenue. Toutefois chez ces patientes traitées en consultation externe, les dates de début des infections n'étaient pas connues. En inoculant des souches de *C. trachomatis* du biovar MoPn ou LGV (SA-2f) dans l'utérus, les bourses ovariennes ou les trompes de souris sensibles, Landers et *al.* (1993) et Tuffrey et *al.* (1982) ont montré que les titres des Ac anti-*Chlamydia* pouvaient être considérablement élevés dès les premiers jours suivant l'infection. Mais il a été démontré que lorsque le traitement est instauré tôt après l'inoculation, quelle que soit la voie utilisée, les lésions histologiques et la réaction sérologique sont moins prononcées contrairement aux circonstances de traitements tardifs et d'absence totale de traitement (Beale & Upshon, 1994; Landers et *al.*, 1993). Ces effets du traitement précoce sur la pathogénèse ont été rapportés dans de nombreux autres modèles animaux d'infection urogénitale inoculés avec diverses souches de *C. trachomatis* ou des isolats de *C. psittaci* GPIC (Nakata et *al.*, 1992; Patton et *al.*, 1993, 1997; Swenson et *al.*, 1986; Tuffrey et *al.*, 1991, 1994; Zana et *al.*, 1991).

La comparaison des résultats selon les formulations d'antibiotique administrées, toutes doses confondues, a montré que la proportion de souris ayant une sérologie chlamydienne positive était plus importante chez les animaux traités par la Dox (96,3 %; 132/137) que chez ceux qui ont été traités avec des CaL-Dox (87,7 %; 122/139): cette différence liée à la formulation de l'antibiotique était statistiquement significative ($P:0,008$). De même, les taux de sérologies positives étaient plus importants chez les souris traitées avec 3 doses d'antichlamydiens (99,3 %; 137/138) que chez celles qui en avaient reçu 7 (84,8 %; 117/138), toutes formulations confondues ($P:0,001$). Ces résultats ont montré que l'essentiel n'était pas de commencer tôt le traitement: en plus, il fallait que les doses soient appropriées. De tels résultats ont été rapportés chez des souris infectées par des sérotypes E ou F et traitées avec l'azithromycine (Tuffrey et al., 1991, 1994) ou par la roxithromycine (Zana et al., 1991).

La sérologie chlamydienne était positive pour toutes les souris du groupe des témoins positifs et du régime de 3 Dox; les taux de positivité ont été de 98,5 %, 92,6 % et 77,1 % avec les régimes de 3 CaL-Dox, 7 Dox et 7 CaL-Dox respectivement. Les analyses statistiques ont montré que seul le régime de 7 CaL-Dox avait entraîné une réduction significative des taux de séropositivité comparativement au groupe des souris témoins positifs ($P < 0,05$). En comparant les 4 régimes de traitement entre eux, les analyses statistiques ont montré que le régime de 7 CaL-Dox a entraîné une réduction plus importante du taux de séropositivité que ceux des 3 doses de Dox et de CaL-Dox. Par ailleurs, le taux obtenu avec le régime de 3 CaL-Dox était comparable à ceux des régimes de 3 Dox et 7 Dox.

Ces différents résultats ont montré que dans nos conditions expérimentales, l'application d'un traitement basé sur 7 doses de CaL-Dox pouvait réduire significativement le taux de séropositivité chez des souris infectées par *C. trachomatis* L₂/434/Bu.

Les déterminations de moyennes géométriques des titres (MGT) d'anticorps totaux anti-*C. trachomatis* lors des différentes périodes de sacrifice (s1 à s8), ont permis d'évaluer la cinétique des Ac sériques totaux anti-chlamydiens dans les différents groupes de souris infectées (Article IV). Dès la période s1, les Ac pouvaient être détectés dans tous les groupes de souris: les élévations de titres étaient plus homogènes chez les témoins positifs que chez les souris traitées avec des antichlamydiens, particulièrement chez celles du

régime de 7 CaL-Dox. Chez les témoins positifs, les titres ont très lentement augmenté pour atteindre leur valeur maximale à la période s6. Avec le régime de 3 Dox, le titre maximal a été atteint à la période s3, beaucoup plus rapidement que chez les témoins positifs et tous les autres groupes de traitement au sein desquels les pics n'ont été atteints qu'à la période s5. Les MGT d'anticorps totaux anti-*C. trachomatis* avaient particulièrement baissé à la période s7 avec le régime de 7 CaL-Dox avant l'administration de la cortisone. En inoculant une souche de *C. trachomatis* L₂ (SA-2f) dans les utérus de souris CBA immunocompétantes par voie transcervicale, Tuffrey et al. (1982) ont détecté des titres d'anticorps sériques antichlamydiens beaucoup plus élevés avec des pics atteints dès la 2ème semaine p.i (date qui correspond à notre période de sacrifice s2: j10 p-i); dans leur expérience, les titres sont restés très élevés pendant plus de 9 semaines. Même si dans notre étude, les examens bactériologiques et histologiques ont permis de constater l'invasion de l'utérus et des trompes dès la période s1, l'inoculation directe d'une telle souche virulente dans l'utérus de souris prétraitées avec la progestérone pourrait contribuer à l'induction d'une réponse de l'immunité humorale plus importante que celle observée au cours de l'infection établie par voie naturelle. De plus, le tropisme des souches chlamydiennes du biovar LGV pourrait être pris en compte dans un tel développement rapide de la réponse immunitaire de l'hôte. Par ailleurs, lorsque Landers et al. (1993) ont inoculé *C. trachomatis* MoPn dans les bourses ovariennes et les trompes de souris Swiss-Webster femelles, ils ont obtenu une importante élévation de titres des Ac sériques totaux dès la première semaine et qui sont demeurés hauts au delà de 9 semaines p-i. L'administration de tétracycline aux animaux infectés 2 ou 5 j p-i, pendant 14 j consécutifs, leur a permis de réduire significativement les titres de ces Ac par rapport au pic observé chez les souris non traitées, mais ces titres étaient restés élevés au terme des 9 semaines de l'étude. Ces résultats sont en désaccord avec ceux observés par Cunningham (1995) chez les femmes. Le seul point commun entre ces différentes études est que dès lors que l'infection est établie, le traitement peut affecter les titres, mais il ne supprime pas les Ac sanguins. Les analyses des MGT des Ac sériques totaux à la période s8, après administration de la cortisone aux souris qui étaient restées dans chacun des groupes, ont montré des élévations plus ou moins importantes de titres aussi bien chez les témoins positifs que dans les régimes de 3 Dox, 3 CaL-Dox et 7 Dox; cependant aucune variation n'a été observée avec le régime de 7 CaL-Dox. La cortisone exerce un effet immunosuppresseur qui contribue à la réactivation et à la

dissémination des corps chlamydiens dans l'organisme infecté ainsi qu'à l'aggravation des lésions histologiques (Cotter *et al.*, 1997a; Malinverni *et al.*, 1995; Pal *et al.*, 1998). Chez les souris soumises aux régimes de 3 Dox, 3 CaL-Dox et de 7 Dox, les élévations de MGT pourraient être liées à des réactivations de corps chlamydiens inhérentes à l'administration de cortisone. En effet, la culture de *C. trachomatis* était positive chez 6 souris sur 7 dans le groupe des témoins positifs et chez 6/10 dans celui des 3 CaL-Dox, chez 6/9 dans le groupe de 3 Dox contre 3/10 dans le groupe de 7 Dox et 1/10 dans celui des 7 CaL-Dox. Brunham *et al.* (1983) ont montré qu'il existe une forte corrélation entre l'isolement quantitatif de *C. trachomatis* de l'endocol de femmes souffrant de cervicites et les élévations importantes des titres sériques de certaines classes d'immunoglobulines dont les IgM. Dans notre étude, nous avons plutôt titré les Ac sériques totaux et réalisé une simple détection et non une numération des micro-organismes dans les cultures d'écouvillonnages vaginaux recueillis chez les souris. Cependant, les corps chlamydiens libérés secondairement dans le tractus génital pourraient avoir induit une nouvelle production d'anticorps qui seraient composés essentiellement d'IgM.

En somme, l'application du régime de 7 CaL-Dox aux souris CF-1 femelles infectées avec *C. trachomatis* L₂ /434/Bu a entraîné une altération plus marquée de la production des Ac anti-chlamydiens sériques.

En utilisant la culture comme méthode de référence, l'évaluation des caractéristiques de la microimmunofluorescence (MIF) a montré que pour l'ensemble des échantillons examinés simultanément par les 2 méthodes, ce test sérologique était sensible à 95,17 % et spécifique à 18,42 % avec une valeur prédictive positive (VPP) de 47,10 % et une valeur prédictive négative (VPN) de 83,33 %. La proportion des sérums positifs (titre \geq 1:16) par le tests de MIF (87,46%) était plus de 2 fois supérieure à celle des cultures positives (43,28 %): cette différence était statistiquement significative ($P: 0,001$). La MIF est la technique de référence pour le diagnostic des infections à *C. pneumoniae*, particulièrement pour la détection des IgM chez les enfants (Kuo *et al.*, 1995). Bien qu'elle soit aussi la méthode la plus sensible pour le titrage des Ac anti-chlamydiens (Darougar, 1985), son utilité dans le diagnostic des infections génitales chlamydiennes dues à des souches du biovar trachoma ne fait pas l'unanimité (Black, 1997; CDC, 1993; Chernesky *et al.*, 1998; Numazaki, 1998;). Toutefois, il apparaît de plus en plus évident que le titrage

des Ac sériques constitue un excellent indicateur dans certaines complications de ces infections génitales, particulièrement lorsque les Ac déterminés sont spécifiques de la protéine de stress thermique, la Hsp60 et que leur caractérisation est faite avec des Ac monoclonaux (Brunham & Peeling, 1994; Domeika *et al.*, 1998; Toye *et al.*, 1993). De nombreuses études cliniques ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre les titres élevés des Ac anti-Hsp60 chlamydiennes et les salpingites ainsi que les stérilités tubaires (Arno *et al.*, 1995; Brunham & Peeling, 1994; Horner *et al.*, 1997; Peeling *et al.*, 1997). Le diagnostic sérologique est moins onéreux et d'exécution plus rapide que la culture. L'opportunité de son utilisation doit tenir compte de la prévalence de l'infection chlamydienne dans la population d'étude (Black, 1997; Thejls *et al.*, 1994). Nos groupes de souris étaient assimilables à une population qui avait une prévalence élevée. Dans de telle circonstance, il importait que le test de MIF soit sensible et surtout très spécifique. Mais cette caractéristique ne pouvait être obtenue qu'en plaçant le titre seuil de positivité à une valeur strictement supérieure à 1:16.

À l'exception de quelques cas, il est de règle que le diagnostic sérologique d'une infection soit établi sur l'utilisation de 2 échantillons distincts: l'un précoce, recueilli pendant la phase aiguë de la maladie et l'autre tardif, recueilli pendant la convalescence. Mais la majorité des infections génitales chlamydiennes aiguës sont asymptomatiques: à cette période, le titrage des Ac n'est pas réalisable. Lorsqu'il devient possible d'analyser les 2 sérums, Theunissen *et al.* (1994) ont montré que le titrage des Ac anti-chlamydiens spécifiques peut être d'une valeur prédictive supérieure à la PCR et à la culture. Par ailleurs, Dabekausen *et al.* (1994) ont montré que la valeur prédictive des tests de détection des Ac anti-chlamydiens était supérieure à celle de la salpingographie dans le diagnostic des stérilités tubaires. Dans notre étude, nous avons analysé un seul sérum par souris, et la sensibilité de la MIF était supérieure à celle de l'histologie.

La sensibilité et la spécificité des examens histologiques étaient de 68,30 % et 56,25 % respectivement et leurs VPP et VPN étaient de 53,59 % et 70,59 % respectivement. La proportion de souris ayant des examens histologiques positifs (54,20 %) était plus importante que celle des cultures (42,51 %) effectuées chez les mêmes animaux: cette différence était statistiquement significative également ($P: 0,001$). Le processus de collecte des échantillons est plus agressif dans les écouvillonnages cervico-vaginaux et les collectes de sang. De plus, les réactions histopathologiques observées ne sont pas spécifiques de *C.*

trachomatis: la valeur numérique de leur spécificité n'a d'intérêt véritable dans le diagnostic histologique des infections chlamydiennes que lorsqu'elle est associée à une détection simultanée du pathogène.

Ces différents résultats nous ont permis de conclure que le titrage des Ac sériques anti-chlamydiens spécifiques pouvait être important dans le suivi du cours de l'infection et du traitement dans les chlamydioses génitales. Et cet intérêt serait encore plus accru avec l'utilisation d'antigènes ou d'anticorps plus spécifiques.

CHAPITRE 8 : CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre étude constitue la première expérience d'encapsulation de la Dox dans des liposomes, de l'évaluation de la stabilité et des activités anti-chlamydiennes de ces formulations. Les résultats obtenus *in vitro* ont montré que la Dox encapsulée dans les liposomes était plus efficace que l'antibiotique sous sa forme libre dans les systèmes cellulaires infectés par *C. trachomatis*, particulièrement contre une souche aussi virulente que celle que nous avons utilisée. *In vivo*, nous avons démontré pour la première fois, que non seulement les souris femelles de la lignée CF-1 constituaient des modèles expérimentaux pour l'étude des infections génitales établies par voie vaginale avec le sérotype L₂ du biovar LGV de *C. trachomatis*, mais surtout que les lésions histologiques observées touchaient aussi l'utérus et les trompes. Dans ce modèle murin d'infection génitale expérimentale à *C. trachomatis*, les résultats ont montré que ni le régime de réduction à 3 doses, ni le régime de 7 doses n'ont permis d'obtenir avec les CaL-Dox des guérisons bactériologiques statistiquement supérieures à celle de la Dox libre. Cependant, les données sérologiques et histopathologiques ont montré que les CaL-Dox étaient plus efficaces contre les élévations importantes des titres des Ac totaux et la survenue des lésions tissulaires au niveau du tractus génital de ces souris. Les mécanismes de la pathogénèse des infections chlamydiennes, particulièrement dans les salpingites, ne sont pas encore totalement élucidés; mais l'unanimité est faite sur le caractère immunopathologique des infections chlamydiennes. Aucun des antichlamydiens disponibles actuellement, ne permet d'empêcher les réactions histopathologiques lorsqu'il est administré dans des délais identiques au nôtre. En l'absence de vaccin disponible contre les infections chlamydiennes, les résultats obtenus avec les CaL-Dox sont encourageants et devraient inciter à évaluer les activités antichlamydiennes des formulations liposomales d'autres antibiotiques tels les fluoroquinolones. Ces évaluations sont d'applications relativement plus simples que la mise au point de vaccins ou de nouvelles molécules antichlamydiennes. Dans notre étude, nous n'avons pas évalué la pharmacocinétique de l'antibiotique liposomal chez les modèles murins: cet aspect mériterait d'être exploré dans d'autres études prospectives futures. De même, la mise au point de technique de détection de marqueurs moléculaires de la viabilité des corps chlamydiens qui serait à la fois précise et peu coûteuse, permettrait de simplifier la détection du pathogène et d'étendre son application à d'autres sites que la partie cervico-

vaginale du tractus génital. Par ailleurs, dans ces études futures il importera aussi d'évaluer les réponses de l'immunité à médiation cellulaire de l'hôte qui seraient co-impliquées dans la résolution de l'infection chlamydienne.

La bonne compréhension du potentiel thérapeutique des antichlamydiens encapsulés dans des liposomes pourrait être d'un apport considérable dans la lutte contre les infections chlamydiennes tant chez l'enfant que chez l'adulte, et limiter ainsi ses conséquences socio-économiques.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Abra RM, Hunt CA & Lau DT.** Liposome disposition *in vivo* VI: delivery to the lung. *J Pharm Sci* 73: 203-206, 1984.
- Adams DH, Joyce G, Richardson VJ, Ryman BE & Wisniewski HM.** Liposome toxicity in the mouse central nervous system. *J Neurol Sci* 31: 173-179, 1977.
- Al-Awadhi H, Stokes GV & Reich M.** Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in mouse fibroblasts by liposome-encapsulated tetracycline. *J Antimicrob Chemother* 30: 303-311, 1992.
- Allan I, Hatch TP & Pearce JH.** Influence of cysteine deprivation on chlamydial differentiation from reproductive to infective life-cycle forms. *J Gen Microbiol* 131: 3171-3177, 1985.
- Allan I & Pearce JH.** Amino acid requirements of strains of *Chlamydia trachomatis* and *C. psittaci* growing in McCoy cells: relationship with clinical syndrome and host origin. *J Gen Microbiol* 129: 2001-2007, 1983.
- Allen JE, Cerrone MC, Beatty PR & Stephens RS.** Cysteine-rich outer membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* display compensatory sequence changes between biovariants. *Mol Microbiol* 4: 1543-1550, 1990.
- Allen JE, Locksley RM & Stephens RS.** A single peptide from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* elicits T cell help for the production of antibodies to protective determinants. *J Immunol* 147: 674-679, 1991.
- Allen TM & Smuckler EA.** Liver pathology accompanying chronic liposome administration in mouse. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 50: 281-290, 1985.
- Allison AC.** Immunological adjuvants and their modes of action. *Arch Immunol Ther Exp* 45: 141-147, 1997.
- Alving CR, Koulchin V, Glenn GM & Rao M.** Liposomes as carriers of peptides antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 145: 5-31, 1995.
- Amselem S, Cohen R & Barenholz Y.** In vitro tests to predict in vivo performance of liposomal dosage forms. *Chem Phys Lipids* 64: 219-237, 1993.
- An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA, Weisburg WG, Klinger JD & Olive DM.** Infection with a plasmid-free variant *Chlamydia* related to

Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection. J Clin Microbiol 30: 2814-2821, 1992.

Anderson JC & Kirby CJ. The effect of incorporation of cloxacillin in liposomes on treatment of experimental staphylococcal mastitis in mice. J Vet Pharmacol Ther 9: 303-309, 1986.

Antos M, Trafny EA & Grzybowski J. Antibacterial activity of liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. 1995. Pharmacol Res 32: 85-87, 1995.

Arakawa E, Imai Y, Kobayashi H, Okumura K & Sezaki H. Application of drug-containing liposomes to the duration of the intramuscular absorption of water-soluble drugs in rats. Chem Pharm Bull 23: 2218-2222, 1975.

Argast M & Beck CF. Tetracycline diffusion through phospholipid bilayers and binding to phospholipids. Antimicrob Agents Chemother 26: 263-265, 1984.

Argast M & Beck CF. Tetracycline uptake by susceptible *Escherichia coli*. Arch Microbiol 141: 260-265, 1985.

Arno JN, Yuan Y, Cleary RE & Morrison RP. Serologic responses of infertile women to the 60-kd chlamydial heat shock protein (hsp60). Fertil Steril 64: 730-735, 1995.

Assil KK, Frucht-Perry J, Ziegler E, Schanzlin DJ, Schneiderman T & Weinreb RN. Tobramycin liposomes. Single subconjunctival therapy of pseudomonal keratitis. Invest Ophthalmol Vis 32: 3216-3220, 1991.

Baehr W, Zhang Y-X, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett KDE & Caldwell HD. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4000-4005, 1988.

Bakker-Woudenberg IA, Kate MT, Stearne-Cullen LE & Woodle MC. Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. J Infect Dis 171: 938-947, 1995.

Bakker-Woudenberg IAJM & Lokerse AF. Liposomes and lipid carriers in the treatment of microbial infections. Scand J Infect Dis 74 Suppl: 34-41, 1991.

Bakker-Woudenberg IA, Lokerse AF & Roerdink FH. Effect of lipid composition on activity of liposome-entrapped ampicillin against intracellular *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother 32: 1560-1564, 1988a.

- Bakker-Woundenberg IA, Lokerse AF & Roerdink FH.** Antibacterial activity of liposome-entrapped ampicillin in vitro and in vivo in relation to the lipid composition. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 321-327, 1989.
- Bakker-Woundenberg IA, Lokerse AF, Roerdink FH, Regts D & Michel MF.** Free versus liposome-entrapped ampicillin in treatment of infection due to *Listeria monocytogenes* in normal and athymic (nude) mice. *J Infect Dis* 151: 917-924, 1985.
- Bakker-Woundenberg IA, Lokerse AF, Vink-van den Berg JC & Roerdink FH.** Liposome-encapsulated ampicillin against *Listeria monocytogenes* in vivo and in vitro. *Infection* 16 Suppl 2: s165-s170, 1988b.
- Bakker-Woundenberg IA, Lokerse AF, Vink-van den Berg JC, Roerdink FH & Michel MF.** Effect of liposome-entrapped ampicillin on survival of *Listeria monocytogenes* in murine peritoneal macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 295-300, 1986.
- Bannantine JP, Rockey DD & Hackstadt T.** Tandem genes of *Chlamydia psittaci* that encode proteins localized to the inclusion membrane. *Mol Microbiol* 28: 1017-1026, 1998.
- Bally MB, Hope MJ, Mayer LD, Madden TD & Cullis PR.** Novel procedures for generating and loading liposomal systems. In Gregoriadis G (ed). *Liposomes as drug carriers*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, pp 841-853, 1988.
- Bangham AD, Standish MM & Watkins JC.** Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13: 238-252, 1965.
- Barenholz Y, Amselem S & Lichtenberg D.** A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes) - French Press. *FEBS Lett* 99: 210-214, 1979.
- Barron AL, White HJ, Rank RG, Soloff BL & Moses EB.** A new animal model for the study of *Chlamydia trachomatis* genital infections: infection of mice with the agent of mouse pneumonitis. *J Infect Dis* 143: 63-66, 1981.
- Barden TC, Buckwalter BL, Testa RT, Petersen PJ & Lee VJ.** "Glycylcyclines". 3,9-aminodoxycyclinecarboxamides. *J Med Chem* 37: 3205-3211, 1994.
- Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C & Weinstein L.** Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 8: 713-720, 1975.
- Batteiger BE, Fraiz J, Newhall WJ, Katz BP & Jones RB.** Association of recurrent chlamydial infection with gonorrhoea. *J Infect Dis* 159: 661-669, 1989.

- Batteiger BE, Newhall V WJ & Jones RB.** Differences in outer membrane proteins of lymphogranuloma venereum and trachoma biovars of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 50: 488-494, 1985.
- Bauwens JE, Lampe MF, Suchland RJ, Wong K & Stamm WE.** Infection with *Chlamydia trachomatis* lymphogranuloma venereum serovar L1 in homosexual men with proctitis: molecular analysis of an unusual case cluster. *Clin Infect Dis* 20: 576-581, 1995.
- Bavoil PM, Hsia R-C & Rank RG.** Prospect for a vaccine against *Chlamydia trachomatis* genital disease. I.-Microbiology and pathogenesis. *Bull Inst Pasteur* 94: 5-54, 1996.
- Bavoil P, Ohlin A & Schachter J.** Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 44: 479-485, 1984.
- Bavoil P, Stephens RS & Falkow S.** A soluble 60 kilodalton antigen of *Chlamydia* spp. Is a homologue of *Escherichia coli* groEL. *Mol Microbiol* 4: 461-469, 1990.
- Beaulac C, Clement-Major S, Hawar J & Lagacé J.** Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 665-669, 1996.
- Beaulac C, Sachtelli S & Lagace J.** In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 41: 35-41, 1998.
- Beale AS.** Does *Chlamydia trachomatis* MoPn enter a microbiologically-inapparent state during experimental infection of the mouse genital tract? *Microb Pathog* 22: 99-112, 1997.
- Beale AS & Upshon PA.** Characteristics of murine model of genital infection with *Chlamydia trachomatis* and effects of therapy with tetracyclines, amoxicillin-clavulanic acid, or azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1937-1943, 1994.
- Beatty WL, Morrison RP & Byrne GI.** Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 58: 686-699, 1994.
- Benedict S and Colagreco J.** Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS. *Cancer Nurs* 17: 411-417, 1994.
- Benita S & Devissaguet JP.** Pharmacocinétique des liposomes et des principes actifs encapsulés dans les liposomes. Dans Puisieux F et Delattre J (eds). *Les liposomes: applications thérapeutiques*. Tec & Doc- Lavoisier, Paris, pp 173-204, 1985.

- Bermudez LE, Yau-Young AO, Lin JP, Cogger J & Young LS.** Treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection of beige mice with liposome-encapsulated aminoglycosides. *J Infect Dis* 161: 1262-1268, 1990.
- Berry JD, Peeling RW & Brunhham RC.** Analysis of the original antigenic sin antibody response to the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis* 179: 180-186, 1999.
- Betageri GV, Jenkins SA & Parsons DL.** Liposome drug delivery systems. Technomic Publishing Co. Lancaster, 1993
- Beutler AM, Schumacher Jr HR, Whittum-Hudson JA, Salameh WA & Hudson AP.** Case report: in situ hybridization for detection of inapparent infection with *Chlamydia trachomatis* in synovial tissue of a patient with Reiter's syndrome. *Am J Med Sci* 310: 206-213, 1995.
- Bienvenue A & Philippot J.** Interaction des liposomes avec les cellules. Dans Puisieux F et Delattre J (eds). Les liposomes: applications thérapeutiques. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, pp 147-171, 1985.
- Birkelund S, Lundemose AG & Christiansen G.** Characterization of native and recombinant 75-kilodalton immunogens from *Chlamydia trachomatis* serovar L₂. *Infect Immun* 57: 2683-2690, 1989.
- Birkelund S, Lundemose AG & Christiansen G.** The 75-kilodalton cytoplasmic *Chlamydia trachomatis* L₂ polypeptide is a DnaK-like protein. *Infect Immun* 58: 2098-2104, 1990.
- Birkelund S, Mygind P, Holm A, Larsen B, Beck F & Christiansen G.** Characterization of two conformational epitopes of the *Chlamydia trachomatis* serovar L₂ DnaK immunogen. *Infect Immun* 64: 810-817, 1996.
- Birkelund S & Stephens RS.** Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* L₂ by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* 174: 2742 - 2747, 1992.
- Black CM.** Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 10: 160-184, 1997.
- Blander SJ & Amortegui AJ.** Mice immunized with a chlamydial extract have no increase in early protective immunity despite increased inflammation following genital infection by the mouse pneumonitis agent of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 62: 3617-3624, 1994.

- Böcker R, Warnke L & Estler C-J.** Blood and organ concentrations of tetracycline and doxycycline in female mice. *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 34: 446-448, 1984.
- Böcker R and Estler C-J.** Comparison of distribution of doxycycline in mice after oral and intravenous application measured by a high-performance liquid chromatography method. *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 31: 2116-2117, 1981.
- Böcker R, Estler C-J & Weber A.** Metabolism of doxycycline. *Lancet* ii: 1155, 1982.
- Bonventre PF & Gregoriadis G.** Killing of intraphagocytic *Staphylococcus aureus* by dihydrostreptomycin entrapped within liposomes. *Antimicrob Agents Chemother* 13: 1049-1051, 1978.
- Boothe JH, Morton II J, Petisi JP, Wilkinson RG & Williams JH.** Tetracycline. *J Am Chem Soc* 75: 4621, 1953.
- Brade H, Brade L & Nano FE.** Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2508-2512, 1987.
- Brown JR & Ireland DS.** Structural requirements for tetracycline activity. *Adv Pharmacol Chemother*, 15: 161-202, 1978 .
- Brown KN & Percival A.** Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. *Scand J Infect Dis Suppl* 44: 251-260, 1978.
- Brunham RC, Kuo C-C, Cles LL & Holmes KK.** Correlation of host immune response with quantitative recovery of *Chlamydia trachomatis* from the human endocervix. *Infect Immun* 39: 1491-1494, 1983.
- Brunham RC, Laga M, Simonsen JN, Cameron DW, Peeling R, McDowell J, Pamba H, Ndinya-Achola JO, Maitha G & Plummer FA.** The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among mothers of children with trachoma. *Am J Epidemiol* 132: 946-952, 1990.
- Brunham RC & Peeling RW.** *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect Agents Dis* 3: 218-233, 1994.
- Brunham RC, Peeling R, MacLean I, Kosseim ML & Paraskevas M.** *Chlamydia trachomatis*-associated ectopic pregnancy: serologic and histologic correlates. *J Infect Dis* 165: 1076-1081, 1992.
- Brunham RC, Plumer FA & Stephens RS.** Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect Immun* 61: 2273-2276, 1993.

- Bryant SG, Fisher D & Kluge RM.** Increased frequency of doxycycline side effects. *Pharmacother* 7: 125-129, 1987.
- Burstein GR, Gaydos CA, Diener-West M, Howell R, Zenilman JM & Quinn TC.** Incident *Chlamydia trachomatis* infections among inner-city adolescents females. *JAMA* 280: 521-526, 1998.
- Cabanes A, Reig F, Anton JM & Arboix M.** Sustained release of liposome-encapsulated enrofloxacin after intramuscular administration in rabbits. *Am J Vet Res* 56: 1498-1501, 1995.
- Cabanes A, Reig F, Garcia-Anton JM & Arboix M.** Evaluation of free and liposome-encapsulated gentamicin for intramuscular sustained release in rabbits. *Res Vet Sci* 64: 213-217, 1998.
- Cain TK & Rank RG.** Local Th-1 like responses are induced by intravaginal infection of mice with the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 63: 1784-1789, 1995.
- Caldwell HD, Kromhout J & Schachter J.** Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 31: 1161-1176, 1981.
- Caldwell HD, Kuo C-C & Kenny GE.** Antigenic analysis of *Chlamydiae* by two-dimensional immunoelectrophoresis. I. Antigenic heterogeneity between *C. trachomatis* and *C. psittaci*. *J Immunol* 115: 963-968, 1975.
- Campbell PI.** Toxicity of some charged lipids used in liposome preparations. *Cytobios* 37: 21-26, 1983.
- Campbell LA, Patton DL, Moore DE, Cappuccio AL, Mueller BA & Wang S-P.** Detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in women with tubal infertility. *Fertil Steril* 59: 45-50, 1993.
- Cappuccio AL, Patton DL, Kuo C-C & Campbell LA.** Detection of of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in monkey models (*Macaca nemestria*) of salpingitis by in situ hybridization: implications for pathogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 171: 102-110, 1994.
- Cates W Jr & Wasserheit JH.** Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 164: 1771-1781, 1991.

- Cavaillon J-M.** Les endotoxines. In Eyquem A, Alouf J, Montagnier L (eds). Traité de microbiologie clinique. PICCIN, Padoue, pp89-104, 1998.
- CDC.** Policy guidelines for prevention and management of pelvic inflammatory disease (PID). MMWR 40 (RR-5): 1-25, 1991.
- CDC.** Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. MMWR 42: 1-39, 1993.
- CDC.** 1998 Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. MMWR 47 (RR-1): 1-118.
- Cerin Å, Grillner L & Persson E.** *Chlamydia* test monitoring during therapy. Int J STD & AIDS 2: 176-179, 1991.
- Chadwick PR & Mellersh AR.** The use of a tissue culture model to assess the penetration of antibiotics into epithelial cells. J Antimicrob Chemother 19: 211-220, 1987.
- Chang J-J, Leonard KR & Zhang Y-X.** Structural studies of the surface projections of *Chlamydia trachomatis* by electron microscopy. J Med Microbiol 46: 1013-1018, 1997.
- Cheema MA, Schumacher HR & Hudson AP.** RNA-directed molecular hybridization screening: evidence for inapparent chlamydial infection. Am J Med Sci 302: 261-265, 1991.
- Chen B, Stout R & Campbell WF.** Nitric oxide production: a mechanism of *Chlamydia trachomatis* inhibition in interferon- γ -treated RAW264.7 cells. FEMS Immunol Med Microbiol 14: 109-120, 1996.
- Chen C-R & Stephens RS.** Trachoma and LGV biovars of *Chlamydia trachomatis* share the same glycosaminoglycan-dependent mechanism for infection of eukaryotic cells. Mol Microbiol 11: 501-507, 1994.
- Chernesky M, Luinstra K, Sellors J, Schachter J, Moncada J, Caul O, Paul I, Mikaelian L, Toyé B, Paavnonen J & Mahony J.** Can serology diagnose upper genital tract *Chlamydia trachomatis* infections ? Studies on women with pelvic pain, with or without chlamydial plasmid DNA in endometrial biopsy tissue. Sex Transm Dis 25: 14-19, 1998.
- Chonn A & Cullis PR.** Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 30: 73-83, 1998.
- Chopra I.** Molecular mechanisms involved in the transport of antibiotics into bacteria. Parasitology 96 Suppl: s25-s44, 1988.

- Chopra I, Bowe TCB, Linton AH, Linton KB, Richmond MH & Speller DCE.** The tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980's. *J Antimicrob Chemother* 8: 5-21, 1981.
- Chopra I & Hacker K.** Uptake of minocycline by *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 29: 19-25, 1992.
- Chopra I, Hawkey PM & Hinton M.** Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother* 29: 245-277, 1992.
- Chopra I, Ismail S & Oliva B.** Lack of evidence for a saturable tetracycline transport system in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2643-2644, 1991.
- Clad A, Flecken U & Petersen EE.** Chlamydial serology in genital infections: ImmunoComb versus Ipazyme. *Infection* 21: 384-389, 1993.
- Clad A, Freidank H, Plünnecke J, Jung B & Petersen EE.** *Chlamydia trachomatis* species specific serology: ImmunoComb *Chlamydia* bivalent versus microimmuno fluorescence (MIF). *Infection* 22: 165-173, 1994.
- Clark RB, Schatzki PF & Dalton HP.** Ultrastructural analysis of the effects of erythromycin on the morphology and developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* HAR-13. *Arch Microbiol* 133: 278-282, 1982.
- Col NF & O'Connor RW.** Estimating worldwide current antibiotic usage: report of Task Force 1. *Rev Infect Dis* 9 (Suppl 3): s232-243, 1987.
- Comanducci M, Cevenini R, Moroni A, Giuliani MM, Ricci S, Scarlato V & Ratti G.** Expression of a plasmid gene of *Chlamydia trachomatis* encoding a novel 28 kDa antigen. *J Gen Microbiol* 139: 1083-1092, 1993.
- Comanducci M, Manetti R, Bini L, Santucci A, Pallini V, Cevenini R, Sueur J-M, Orfila J & Ratti G.** Humoral immune response to plasmid protein pgp3 in patients with *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 62: 5491-5497, 1994.
- Comanducci M, Ricci S, Cevenini R & Ratti G.** Diversity of the *Chlamydia trachomatis* common plasmid in biovars with different pathogenicity. *Plasmid* 23: 149-154, 1990.
- Comanducci M, Ricci S & Ratti G.** The structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells. *Mol Microbiol* 2: 531-538, 1988.

- Conlan JW, Clarke IN & Ward ME.** Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Mol Microbiol* 2: 673-679, 1988.
- Conover LH, Moreland WT, English AR, Stephens CR & Pilgrim FJ.** Terramycin. XI. Tetracycline. *J Am Chem Soc* 1953 75: 4622-4623 .
- Conway DJ, Holland MJ, Campbell AE, Bailey RL, Krausa P, Peeling RW, Whittle HC & Mabey DC.** HLA class I and II polymorphisms and trachomatous scarring in a *Chlamydia trachomatis*-endemic population. *J Infect Dis* 174: 643-646, 1996.
- Cooper MJ.** Noninfectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy. *Semin Oncol* 23: 172-187, 1996.
- Cotter TW, Miranpuri GS, Ramsey KH, Poulsen CE & Byrne GI.** Reactivation of chlamydial genital tract infection in mice. *Infect Immun* 65: 2067-2073, 1997a.
- Cotter TW, Ramsey KH, Miranpuri GS, Poulsen CE & Byrne GI.** Dissemination of *Chlamydia trachomatis* chronic genital tract infection in gamma interferon gene knockout mice. *Infect Immun* 65: 2145-2152, 1997b.
- Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, Madden TD, Mayer LD & Janoff A.** Liposomes as pharmaceuticals. *In* Ostro MJ (ed). *Liposomes. From biophysics to therapeutics*. Marcel Dekker Inc. New York, pp 39-72, 1987.
- Cunha BA.** Antibiotic tissue penetration. *N Y Acad Med* 59: 443-449, 1983.
- Cunha BA, Sibley CM & Ristuccia AM.** Doxycycline. *Ther Drug Monitor* 4: 115-135, 1982.
- Cunningham DS.** Immune response characteristics in women with chlamydial genital infection. *Gynecol Obstet Invest* 39: 54-59, 1995.
- Dabekausen YAJM, evers JLH, L, JA & Stals FS.** *Chlamydia trachomatis* antibody testing is more accurate than hysterosalpingography in predicting tubal factor infertility. *Fertil Steril* 61: 833-837, 1994.
- Danilition SL, MacLean IW, Peeling R, Winston S & Brunham RC.** The 75-kilodalton protein of *Chlamydia trachomatis*: a member of the heat shock protein 70 family?. *Infect Immun* 58: 189-196, 1990.
- Darougar S.** The humoral immune response to chlamydial infection in humans. *Rev Infect Dis* 7: 726-730, 1985.

Davies HD, Wang EEL with the Canadian Task Force on Periodic Health Examination. Periodic health examination, 1996 update: 2. Screening for chlamydial infections. *Can Med Assoc J* 154: 1631-1644, 1996.

De Barbeyrac B & Bébéar Ch. *Chlamydia*. *Méd Mal Infect* 27: 71-83, 1997.

De La Maza LM, Pal S, Khamesipour A & Peterson EM. Intravaginal inoculation of mice with *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis biovar results in infertility. *Infect Immun* 62: 2094-2097, 1994.

De Rossi E, Blokpoel MCJ, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young DB, De Smet KAL & Ciferri O. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, *tet* (V), from *Mycobacterium segmentis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1931-1937, 1998.

De Schryver A & Meheus A. Epidemiology of sexually transmitted diseases: the global picture. *Bull WHO* 68: 639-654, 1990.

Deamer D & Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta* 443: 629-634, 1976.

Dean D & Millman K. Molecular and mutation trends analyses of *omp1* alleles for serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Implications for the immunopathogenesis of disease. *J Clin Invest* 99: 475-483, 1997.

Dean D, Oudens E, Bolan G, Padian N & Schachter J. Major outer membrane protein variants of *Chlamydia trachomatis* are associated with severe upper genital tract infections and histopathology in San Francisco. *J Infect Dis* 172: 1013-1022, 1995.

Dean D, Schachter J, Dawson CR & Stephens RS. Comparison of the major outer membrane protein variant sequence regions of B/Ba isolates: a molecular epidemiology approach to *Chlamydia trachomatis* infections. *J Infect Dis* 166: 383-392, 1992.

Dees C & Schultz RD. The mechanism of enhanced intraphagocytic killing of bacteria by liposomes containing antibiotics. *Vet Immunol Immunopathol* 24: 135-146, 1990.

Deol P, Khuller GK & Joshi K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1211-1214, 1997.

DesiderioJV & Campbell SG. Intraphagocytic killing of *Salmonella typhimurium* by liposome-encapsulated cephalotin. *J Infect Dis* 148: 563-570, 1983a.

- DesiderioJV & Campbell SG.** Liposome-encapsulated cephalotin in the treatment of experimental murine salmonellosis. *J Reticuloendothel Soc* 34: 279-287, 1983b.
- Desormeaux A & Bergeron MG.** Liposomes as drug delivery system: a strategic approach for the treatment of HIV infection. *J Drug Target* 6: 1-15, 1998.
- Desormeux A, Harvie P, Perron S, Makabi-Panzu B, Beauchamp D, Tremblay M, Poulin L & Bergeron MG.** Antiviral efficacy, intracellular uptake and pharmacokinetics of free and liposome-encapsulated 2', 3'- dideoxyinosine. *AIDS* 8: 545-553, 1994.
- Dessus-Babus S, Bebear CM, Charron A, Bebear C & De Barbeyrac B.** Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2474-2481, 1998.
- Doerschuk AP, McCormick JRD, Goodman JJ, Szumski SA, Growich JA, Miller PA, Bitler BA, Jensen ER, Petty MA & Phelps AS.** The halide metabolism of *Streptomyces aureofaciens* mutants. The biosynthesis of 7-chloro-, 7-chloro³⁶- and 7-bromotetracycline and tetracycline. *J Am Chem Soc* 78: 1508-1509, 1956.
- Dolin PJ, Faal H, Johnson GJ, Ajewole J, Mohamed AA & Lee PS.** Trachoma in Gambia. *Br J Ophthalmol* 82: 930-933, 1998.
- Domeika M, Domeika K, Paavonen J, Mardh P-A & Witkin SS.** Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis* 177: 714-719, 1998.
- Donnelly H & Hau J.** Animal models in reproductive physiology. In Svendsen P and Hau J (éds). *Handbook of laboratory animal science, Volume II. Animal models.* CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp 53-76, 1994.
- Dousset N & Douste-Blazy L.** Méthodes de préparation des liposomes. Dans Puisieux F et Delattre J (eds). *Les liposomes: applications thérapeutiques.* Tec & Doc-Lavoisier, Paris, pp 41-72, 1985.
- Du Buy HG & Showacre JL.** Selective localisation of tetracycline in mitochondria of living cells. *Science* 113: 196-197, 1981.
- Duggar BM.** Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann New York Acad Sci* 51: 177-181, 1948.

- Dusserre N, Lessard C, Paquette N, Perron S, Poulin L, Tremblay M, Beauchamp D, Desormeaux A & Bergeron MG.** Encapsulation of foscarnet in liposomes modifies drug intracellular accumulation, in vitro anti-VIH-1 activity, tissue distribution and pharmacokinetics. *AIDS* 9: 833-841, 1995.
- Egger M, Low N, Smith GD, Lindblom B & Herrmann B.** Screening for chlamydial infections and the risk of ectopic pregnancy in a country in Sweden: ecological analysis. *BMJ* 316: 1776-1780, 1998.
- Ehret JM & Judson FN.** *Chlamydiae*. In Raoult D (ed). Antimicrobial agents and intracellular pathogens. CRC Press, Boca Raton, pp 201-230, 1993.
- Eltahawy AT.** The penetration of mammalian cells by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 11: 293-298, 1983.
- Farencena A, Comanducci M, Donati M, Ratti G & Cevenini R.** Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect Immun* 65: 2965-2969, 1997.
- Faro S.** *Chlamydia trachomatis*: female pelvic infection. *Am J Obstet Gynecol* 164: 1767-1770, 1991.
- Fattal E, Couvreur P & Puisieux F.** Méthodes de préparation des liposomes. Dans Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R et Schuber F (éds). Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Éditions INSERM et Tec & Doc-Lavoisier, Paris, pp 43-62, 1993.
- Fierer J, Hatlen L, Lin JP, Estrella D, Mihalko P & Yau-Young A.** Successful treatment using gentamicin in liposomes of *Salmonella dublin* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 343-348, 1990.
- Finlay AC, Hobby GL, P'an SY, Regna PP, Routien JB, Seeley DB, Shull GM, Sobin BA, Solomons IA, Vinson JW & Kane JH.** Terramycin, a new antibiotic. *Science* 111: 85-1950.
- Forsgren A & Bellahsène A.** Antibiotic accumulation in human polymorphonuclear leucocytes and lymphocytes. *Scand J Infect Dis Suppl* 44: 16-23, 1985.
- Fountain MW, Weiss SJ, Fountain AG, Shen A & Lenk RP.** Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in in vitro and in vivo by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *J Infect Dis* 152: 529-535, 1985.

- Fourtillan JB & Lefèbvre MA.** Corrélations structure-activité dans la famille des tétracyclines. *Nouv Presse Méd* 9: 64-70, 1980.
- Fourtillan JB & Saux MC.** Comportement pharmacocinétique des tétracyclines. *Rev Assoc Dév Pharm Hosp Sud-Ouest* 2: 23-39, 1977.
- Fourtillan JB & Saux MC.** Intérêt des tetracyclines de deuxième génération. Comportement pharmacocinétique. *Sem Hôp Paris* 54: 224-230, 1978.
- Frost EH, Deslandes S, Gendron D, Bourgaux-Ramoisy D & Bourgaux P.** Variation outside variable segments of the major outer membrane protein distinguishes trachoma from urogenital isolates of the same serovar of *Chlamydia trachomatis*. *Genitourin Med* 71: 18-23, 1995.
- Fukushi H & Hirai K.** Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nova. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* 42: 306-308, 1992.
- Fukushi H & Hirai K.** *Chlamydia pecorum*. The fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol Immunol* 37: 515-522, 1993.
- Gabler WL.** Fluxes and accumulation of tetracyclines by human blood cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 72: 39-51, 1991.
- Gangadharam PR, Ashtekar DA, Ghorri N, Goldstein JA, Debs RJ & Duzgunes N.** Chemotherapeutic potential of free and liposome-encapsulated streptomycin against experimental *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 425-435, 1991.
- Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJ & Derouin F.** Lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 574-577, 1996.
- Gaydos CA, Crotchfelt KA, Howell MR, Kralian S, Hauptman P & Quinn TC.** Molecular amplification assays to detect chlamydial infections in urine specimens from high school female students and to monitor the persistence of chlamydial DNA after therapy. *J Infect Dis* 177: 417-424, 1998.
- Gencay M, Puolakkainen M, Wahlstrom T, Ammala P, Mannonen L, Vaheri A & Koskiniemi ML.** *Chlamydia trachomatis* detected in human placenta. *J Clin Pathol* 50: 852-855, 1997.

- Gerbase AC, Rowley JT & Mertens TE.** Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 351 (Suppl III): 2-4, 1998.
- Goeman J, Meheus A & Piot P.** L'épidémiologie des maladies sexuellement transmissibles dans les pays en développement à l'ère du SIDA. *Ann Soc Belge Med Trop* 71: 81-113, 1991.
- Goldstein DA.** Tetracyclines, pp 287-309. *In* Koren G, Prober CG, Gold R (eds). *Antimicrobial therapy in infants and children*. Marcel Dekker Inc. New York, 1988.
- Golub LM, Schuler EK & Gallagher BM.** New therapeutic uses for old family of drugs: travels of a dental researcher from the lab to the university's office of technology transfer and beyond. *Technol Health Care* 4: 311-316, 1996.
- Gomez-Flores R, Hsia R, Tamez-Guerra R & Mehta RT.** Enhanced intramacrophage activity of resorcinomycin A against *Mycobacterium avium* - *Mycobacterium intracellulare* complex after liposome encapsulation. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2545-2549, 1996.
- Gordon FB & Quan AL.** Drug susceptibilities of psittacosis and trachoma agents. *Ann N Y Acad Sci* 98: 261-270, 1962.
- Gordon FB & Quan AL.** Isolation of the trachoma agent in cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 118: 354-359, 1965.
- Grassi GG.** Tetracyclines. *In* Bergogne-Bérézin E, Dellamonica P (eds). *Antibiothérapie en pratique clinique*. Collection abrégés de médecine. Masson, Paris, pp 173-183, 1995.
- Grayston JT, Kuo C-C, Campbell LA & Wang S-P.** *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 39: 88-90, 1989.
- Grayson LS, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent R, Roehrborn AJ, Kim T & Kim S.** Soft tissue infection prophylaxis with gentamicin encapsulated in multivesicular liposomes: results from a prospective, randomized trial. *Crit Care Med* 23: 84-91, 1995.
- Green RG, Brown JR & Calvert RT.** Estimation of the degree of binding of tetracyclines in human plasma. *J Pharm Pharmacol* 28: 514-515, 1976.
- Gregoriadis G.** Fate of injected liposomes: observations of entrapped solute retention, vesicle clearance and tissue distribution *in vivo*. *In* Gregoriadis G (ed). *Liposomes as drug carriers*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, pp 3-18, 1988.
- Gregoriadis G.** Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharm Res* 15: 661-670, 1998.

Grit M & Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids* 64: 3-18, 1993.

Grun L, Tassano-Smith J, Carder C, Johnson AM, Robinson A, Murray E, Stephenson J, Haines A, Copas A & Ridgway G. Comparison of two methods of screening for genital chlamydial infection in women attending in general practice: cross sectional survey. *BMJ* 315: 226-230, 1997.

Gupta PK, Hung CT & Lam FC. Applications of particule carriers in intratumoral drug delivey. *In* Rolland A (ed). *Pharmaceutical particule carriers. Therapeutic applications.* Marcel Dekker Inc., New york, pp 135-164, 1993.

Hand WL, Boozer RM & King-Thompson NL. Antibiotic uptake by alveolar macrophages of smokers. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 42-45, 1985.

Hand WL, Corwin RW, Steinberg TH & Grossman GD. Uptake of antibiotics by human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 129: 933-937, 1984.

Harms G, Matull R, Randrianasolo D, Andriamiadana J, Rasamindrakotroka A, Kirsch T, Hof U, Rarivoharilala E & Korte R. Pattern of sexually transmitted diseases in a Malagasy population. *Sex Transm Dis* 21: 315-320, 1994.

Hayes LJ, Pecharatana S, Bailey RL, Hampton TJ, Pickett MA, Mabey DCW, Watt PJ & Ward ME. Extent and kinetics of genetic change in the *omp1* gene of *Chlamydia trachomatis* in two villages with endemic trachoma. *J Infect Dis* 172: 268-272, 1995.

Hayes LJ, Yearsley P, Treharne JD, Ballard RA, Fehler GH & Ward ME. Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 62: 5659-5663, 1994.

Herring AJ. The molecular biology of *Chlamydia*: a brief overview. *J Infection* 25 Suppl I: 1-10, 1992.

Hildebrandt J. Models of *Chlamydia* infections. *In* Zak O, Sande MA (eds). *Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Volume 2.* Academic Press Inc., London, pp 275-295, 1986.

Ho JL, He S, Hu A, Geng J, Basile FG, Almeida MGB, Saito AY, Laurence J & Jonhson Jr. WD. Neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative donors induce HIV replication from HIV-infected patients' mononuclear cells and cell

lines: an in vitro model of HIV transmission facilitated by *Chlamydia trachomatis*. J Exp Med 181: 1493-1505, 1995.

Ho Y and Zhang Y-X. The sequence of the *groES* and *groEL* genes from the mouse pneumonitis agent of *Chlamydia trachomatis*. Gene 141: 143-144, 1994.

Holland SM, Hudson AP, Bobo L, Whittum-Hudson JA, Viscidi RP, Quinn TC & Taylor HR. Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state. Infect Immun 60: 2040-2047, 1992.

Hoosen AA, O'Farrell N & van den Ende J. Microbiology of acute epididymitis in a developing community. Genitourin Med 69: 361-363, 1993.

Horner PJ, Cain D, McClure M, Thomas BJ, Gilroy C, Ali M, Weber JN & Taylor-Robinson D. Association of antibodies to *Chlamydia trachomatis* heat-shock protein 60 kD with chronic nongonococcal urethritis. Clin Infect Dis 24: 653-660, 1997.

Hunter I & Hill RA. Tetracyclines. In Strohl WR (ed.). Biotechnology of antibiotics, 2nd edition. Marcel Dekker Inc, New York, pp 659-682, 1997.

Hussenet F, Dousset B, Cordonnier JL, Jacob C, Foliguet B, Grignon G & Nabet P. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 in normal and infected human seminal fluid. Hum reprod 8: 409-411, 1993.

Huang C-H. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. Biochemistry 8: 344-351, 1969.

Huh J, Chen JC, Furman GM, Malki C, King B, Kafie F & Wilson SE. Local treatment of prosthetic vascular graft infection with multivesicular liposome-encapsulated amikacin. J Surg Res 74: 54-58, 1998.

Hutchings BL. Tetracycline transport in *Staphylococcus aureus* H. Biochim Biophys Acta 174: 734-748, 1969.

Hwang KJ. Liposomes pharmacokinetics. In Ostro MJ (ed). Liposomes. From biophysics to therapeutics. Marcel Dekker Inc. New York, pp 109-156, 1987.

-Igietseme JU, Magee DM, Williams DM & Rank RG. Role for CD8+ T cells in antichlamydial immunity defined by *Chlamydia* - specific T - lymphocyte clones. Infect Immun 62: 5195-5197, 1994.

Ingalls RR, Rice PA, Qureshi N, Takayama K, Lin JS & Golenbock DT. The inflammatory response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. Infect Immun 63: 3125-3130, 1995.

- Ito Jr JI, Harrison HR, Alexander ER & Billings LJ.** Establishment of genital tract infection in the CF-1 mouse by intravaginal inoculation of a human oculogenital isolate of *Chlamydia trachomatis*. J Infect Dis 150: 577-582, 1984.
- Ito Jr JI, Lyons JM & Airo-Brown LP.** Variation in virulence among oculogenital serovars of *Chlamydia trachomatis* in experimental genital tract infection. Infect Immun 58: 2021-2023, 1990.
- Jackson AJ.** Intramuscular absorption and regional lymphatic uptake of liposome-entrapped inulin. Drug Metab Dispos 9: 535-540, 1981.
- Jantos C, Baumgärtner W, Durchfeld B & Schiefer HG.** Experimental epididymitis due to *Chlamydia trachomatis* in rats. Infect Immun 60: 2324-2328, 1992.
- Johansson M, Schön K, Ward M & Lycke N.** Genital tract infection with *Chlamydia trachomatis* fails to induce protective immunity in gamma interferon receptor - deficient mice despite a strong local immunoglobulin A response. Infect Immun 65: 1032-1044, 1997.
- Johnson SM, Bangham AD, Hill MW & Korn ED.** Single bilayer liposomes. Biochim Biophys Acta 233: 820-826, 1971.
- Jones RB.** New treatments for *Chlamydia trachomatis*. Am J Obstet Gynecol 164: 1789-1793, 1991.
- Jones RB, Van der Pol B, Martin DH & Shepard MK.** Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. J Infect Dis 162: 1309-1315, 1990.
- Jones RB, Katz BP, Van Der Pol B, Caine VA, Batteiger BE & Newhall V WJ.** Effect of blind passage and multiple sampling on recovery of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. J Clin Microbiol 24: 1029-1033, 1986.
- Joseph TD & Bose SK.** A heat-labile protein of *Chlamydia trachomatis* binds to HeLa cells and inhibits the adherence of chlamydiae. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4054-4058, 1991.
- Kapusnik-Uner JE, Sande MA & Chambers HF.** Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds). Goodman & Gilman's. The

Pharmacological basis of therapeutics. 9th edition. McGraw-Hill, New York, pp 1123-1153, 1996.

Karimi ST, Schloemer RH & Wilde III CCE. Accumulation of chlamydial lipopolysaccharide antigen in the plasma membranes of infected cells. *Infect Immun* 57: 1780-1785, 1989.

Karlowsky JA & Zhanel GG. Concepts on the use of liposomal antimicrobial agents: applications for aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 15: 654-667, 1992.

Kaushic C, Murdin AD, Underdown BJ & Wira CR. *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract of the rat: influence of progesterone on infectivity and immune response. *Infect Immun* 66: 893-898, 1998.

Kelly KA, Robinson EA & Rank RG. Initial route of antigen administration alters the T-cell cytokine profile produced in response to the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis* following genital infection. *Infect Immun* 64: 4976-4983, 1996.

Kende M, Alving CR, Rill WL, Swartz MG Jr & Canonico PG. Enhanced efficacy of liposome-encapsulated ribavirin against Rift Valley fever virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 903-907, 1985.

Khamesipour A, Pal S, Peterson EM & De La Maza LM. Induction of infertility by *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis biovar in strains of mice that differ in their response to 60 kDa heat shock protein. *J Reprod Fertil* 101: 287-294, 1994.

Khan MA, Potter CW & Sharrard RM. A reverse transcriptase-PCR based assay for in-vitro antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 37: 677-685, 1996.

Kim CK & Han JH. Lymphatic delivery and pharmacokinetics of methotrexate after intramuscular injection of differently charged liposome entrapped methotrexate to rats. *J Microencapsul* 12: 437-446, 1995.

Kiser JS, Gale GO & Kemp GA. Antibiotics as feedstuff additives: the risk-benefit equation for man. *CRC Crit Rev Toxicol* 1: 55-92, 1971.

Kitahara T, Yoneyama H & Nakae T. Antibiotic diffusion pathways in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 457-461, 1997.

- Klein RA.** The detection of oxidation in liposome preparation. *Biochem Biophys Acta* 210: 486-489, 1970.
- Klein NC & Cunha BA.** Tetracyclines. *Med Clin North Am* 79: 789-801, 1995.
- Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP & Huang L.** Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 268: 235-237, 1990.
- Koff WC and Filder IJ.** The potential use of liposome-mediated antiviral therapy. *Antiviral Res* 5: 179-190, 1985.
- Koff WC, Showalter SD, Chakrabarty MK, Hampar B, Ceccorulli LM & Kleinnerman ES.** Human monocyte-mediated cytotoxicity against herpes simplex virus-infected cells: activation of cytotoxic monocytes by free and liposome-encapsulated lymphokines. *J Leukoc Biol* 37: 461-472, 1985.
- Kol A, Bourcier T, Lichtman AH & Libby P.** Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 103: 571-577, 1999.
- Kramer MJ & Gordon FB.** Ultrastructural analysis of the effects of penicillin and chlortetracycline on the development of a genital tract *Chlamydia*. *Infect Immun* 3: 333-341, 1971.
- Kronberg B, Dahlman A, Carlfors J, Karlsson J & Artursson P.** Preparation and evaluation of stearyl stabilized liposomes: colloidal stability, serum stability, macrophage uptake, and toxicity. *J Pharm Sci* 79: 667-671, 1990.
- Kuck NA, Forbes M.** Uptake of minocycline and tetracycline by tetracycline-susceptible and -resistant bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 3: 662-664, 1973.
- Kulkarni SB, Betageri GV & Singh M.** Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J Microencapsulation* 12: 229-246, 1995.
- Kuo C-C, Jackson LA, Campbell LA & Grayston JT.** *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8: 451-461, 1995.
- Kuo C-C, Wang S-P & Grayston JT.** Differentiation of TRIC and LGV organisms based on enhancement of infectivity by DEAE-dextran in cell culture. *J Infect Dis* 125: 313-317, 1972.

- Kuo C-C, Wang S-P & Grayston JT.** Antimicrobial activity of several antibiotics and a sulfonamide against *Chlamydia trachomatis* organisms in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* 12: 80-83, 1977.
- Kuo C-C, Wang S-P, Wentworth BB & Grayston JT.** Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *J Infect Dis* 125: 665-668, 1972a.
- Lachman LB, Ozpolat B & Rao XM.** Cytokine-containing liposomes as vaccine adjuvants. *Eur Cytokine Netw* 7: 693-698, 1996.
- Landers DV, Sung ML, Bottles K & Schachter J.** Does addition of anti - inflammatory agents to antimicrobial therapy reduce infertility after murine chlamydial salpingitis ? *Sex Transm Dis* 20: 121-125, 1993.
- Lang JK & Vigo-Pelfrey C.** Quality control of liposomal lipids with special emphasis on peroxidation of phospholipids and cholesterol. *Chem Phys Lipids* 64: 19-29, 1993.
- Layton D, Luckenbach GA, Andreesen R & Munder PG.** The interaction of liposomes with cells: the relation of cell specific toxicity to lipid composition. *Eur J cancer* 16: 1529-1538, 1980.
- Lee CK & Moulder JW.** Persistent infection of mouse fibroblasts (McCoy cells) with a trachoma strain of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 32: 822-829, 1981.
- Lee CT, Thirumoorthy T, Lim KB & Sng EH.** Epidemiology of acute epididymo-orchitis in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 18: 320-323, 1989.
- Lefèvre JC, Lepargneur JP, Guion D & Bei S.** Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Path Biol* 45: 376-378, 1997.
- Leive L, Telesetsky S, Coleman Jr WG & Carr D.** Tetracyclines of various hydrophobicities as a probe for permeability of *Escherichia coli* outer membranes. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 539-544, 1984.
- Levy SB.** Resistance to tetracyclines, pp 191-204. *In* Bryan LE (ed.). *Antimicrobial drug resistance*. Academic Press, Orlando, 1984.
- Levy SB.** Tetracycline resistance determinants are widespread. *ASM News* 54: 418-421, 1988.
- Levy SB.** *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*. Plenum Press, New York, 1992.
- Liautard JP & Philippot JR.** Présentation et analyse d'une méthode de préparation des liposomes unilamellaires pour une utilisation clinique extemporanée. Dans Delattre J,

Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R et Schuber F (éds). Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Éditions INSERM et Tec & Doc-Lavoisier, Paris, pp 63-68, 1993.

Lichtenberg D & Barenholz Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. *Methods Biochem Anal* 33: 337-462, 1988.

Lin J-SL, Donegan SP, Heeren TC, Greenberg M, Flaherty EE, Haivanis R, Su X-H, Dean D, Newhall WJ, Knapp JS, Sarafian SK, Rice RJ, Morse SA & Rice PA. Transmission of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among men with urethritis and their female sex partners. *J Infect Dis* 178: 1707-1712, 1998.

Livermore DM. Antibiotic uptake and transport by bacteria. *Scand J Infect Dis* 74 Suppl: 15-22, 1991.

Löbau S, Mamat U, Brabetz W & Brade H. Molecular cloning, sequence analysis, and functional characterization of the lipopolysaccharide biosynthetic gene *kdtA* encoding 3-deoxy- α -D-manno-octulosonic acid transferase of *Chlamydia pneumoniae* strain TW-183. *Mol Microbiol* 18: 391-399, 1995.

Lopez-Berestein G. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 675-678, 1987a.

Lopez-Berestein G & Juliano RL. Application of liposomes to delivery of antifungal agents. In Ostro MJ (ed). *Liposomes. From biophysics to therapeutics*. Marcel Dekker Inc. New York, pp 253-276, 1987b.

Lukacova M, Baumann M, Brade L, Mamat U and Brade H. Lipopolysaccharide smooth-rough phase variation in bacteria of the genus *Chlamydia*. *Infect Immun* 62:2270-2276, 1994.

Lundemose AG, Birkelund S, Fey SJ, Larsen PM & Christiansen G. *Chlamydia trachomatis* contain a protein similar to the *Legionella pneumophila mip* gene product. *Mol Microbiol* 5: 109-115, 1991.

Lundemose AG, Birkelund S, Larsen PM, Fey SJ & Christiansen G. Characterization and identification of early proteins in *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by two-dimensional gel electrophoresis. *Infect Immun* 58: 2478-2486, 1990.

Lundemose AG, Rouch DA, Birkelund S, Christiansen G & Pearce JH. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein. *Mol Microbiol* 6: 2539-2548, 1992.

- Lutz J, Augustin AJ, Jager LJ, Bachmann D & Brandl M.** Acute toxicity and depression of phagocytosis in vivo by liposomes: influence of lysophosphatidylcholine. *Life Sci* 56: 99-106, 1995.
- Mabey D.** Sexually transmitted diseases in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 97-99, 1996.
- MacLeod DL & Prescott JF.** The use of liposomally-entrapped gentamicin in the treatment of bovine *Staphylococcus* mastitis. *Can J Vet Res* 52: 445-450, 1988.
- Magalhães VD, Schuman W & Castilho BA.** A new tetracycline resistance determinant cloned from *Proteus mirabilis*. *Biochim Biophys Acta* 1443: 262-266, 1998
- Magallanes M, Dijkstra J & Fierer J.** Liposome-incorporated ciprofloxacin in treatment of murine salmonellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2293-2297, 1993.
- Makabi-Panzu B, Lessard C, Perron S, Desormeaux A, Tremblay M, Poulin L, Beauchamp D & Bergeron MG.** Comparison of cellular accumulation, tissue distribution, and anti-HIV activity of free and liposomal 2', 3' - dideoxycytidine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1463-1470, 1994.
- Malinverni R, Kuo C-C, Campbell LA & Grayston JT.** Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *J Infect Dis* 172: 593-594, 1995.
- Manten A.** Antibiotic drugs. In Meyler L, Herxheimer A (eds.) Side effects of drugs. A survey of unwanted effects of drugs reported in 1965-1967, vol. VI. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, and Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, pp 263-314, 1968.
- Manten A.** Antibiotic drugs. In Meyler L, Herxheimer A (eds.) Side effects of drugs. A survey of unwanted effects of drugs reported in 1968-1971, volume VII. Excerpta Medica. Amsterdam, pp 355-403, 1972.
- Mardh P-A & Löwing C.** Treatment of chlamydial infections. *Scand J Infect Dis* 68 Suppl: 23-30, 1990.
- Marchal-Heussler L, Maincent Ph, Hoffman M & Sirbat D.** Intérêt de nouveaux vecteurs de médicaments en ophtalmologie: les liposomes et les nanoparticules. *J Fr Ophtalmol* 13: 575-582, 1990.
- Margolis LB.** Cell interactions with solid and fluid liposomes in vitro: lessons for "liposomologists" and cell biologists, In Gregoriadis G (ed). Liposomes as drug carriers. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, pp 75-92, 1988.

- Martin FJ & McDonald RC.** Lipid vesicle-cell interactions. I. Hemagglutination and hemolysis. *J Cell Biol* 70: 494-505, 1976.
- Martin DH, Mroczkowski TF, Dalu ZA, McCarty J, Jones RB, Hopkins SJ, Johnson RB & the azithromycin for chlamydial infections study group.** A controlled trial of a single dose of azithromycin for treatment of chlamydial urethritis and cervicitis. *N Engl J Med* 327: 921-925, 1992.
- Martin TM & Rosenbaum JT.** Identifying genes that cause disease: HLA-B27, the paradigm, the promise, the perplexity. *Br J Ophthalmol* 82: 1354-1355, 1998.
- Matsumoto A.** Structural characteristics of chlamydial bodies. *In* Barron AL (ed). *Microbiology of Chlamydia*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp 21-45, 1988.
- Matsumoto A, Izutsu H, Miyashita N & Ohuchi M.** Plaque formation by and plaque cloning of *Chlamydia trachomatis* biovar trachoma. *J Clin Microbiol* 36: 3013-3019, 1998.
- Maurin M & Raoult D.** Antibiotic penetration within eukaryotic cells. *In* Raoult D (ed). *Antimicrobial agents and intracellular pathogens*. CRC Press. Boca Raton, pp 23-37, 1993.
- McGrégor JA & French JI.** *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 164: 1782-1789, 1991.
- McMurry ML, Cullinane JC & Levy SB.** Transport of the lipophilic analog minocycline differs from that of the tetracycline in susceptible and resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 791-799, 1982.
- Mellors JW, Debs RJ & Ryan JL.** Incorporation of recombinant gamma interferon into liposomes enhances its ability to induce peritoneal macrophage antitoxoplasma activity. *Infect Immun* 57: 132-137, 1989.
- Metha RT.** Liposome encapsulation of clofazimine reduces toxicity in vitro and in vivo and improves therapeutic efficacy in the beige mouse model of disseminated *Mycobacterium avium-M. Intracellulare* complex infection. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1893-1902, 1996.
- Mehta RT, Hopper RL, McQueen T, Juliano RL & Lopez-Berestein G.** Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1901-1903, 1987.
- Mehta RT, Keyhani A, McQueen TJ, Rosenbaum B, Rolston KV & Tarrand JJ.** In vitro activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium - M.*

- intracellulare* complex and *M. tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 37: 2584-2587, 1993.
- Mercer LJ, Robinson DC, Sahm DF, Lawre MJ & Hajj SN.** Comparison of chemiluminescent DNA probe to cell culture for the screening of *Chlamydia trachomatis* in a gynecology clinic population. Obstet Gynecol 76: 114-117, 1990.
- Merel P.** Les challenges de la PCR. Biofutur (Technoscope) 143: 3-14, 1995.
- Michel-Briand Y.** Mécanismes moléculaires de la bactéricidie. In Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J-P, Goldstein F (eds). Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Maloine, Paris, pp 107-111, 1991.
- Minieri PP, Firman MC, Mistretta AG, Abbey A, Bricker CE, Rigler NE & Sokol H.** A new broad spectrum antibiotic product of the tetracycline group. Antibiot Annu 1953-1954, pp 81-87, 1953.
- Monnickendam MA.** Chlamydial genital infections. In Wright DJM (ed). Immunology of sexually transmitted diseases. (Immunology and medicine series). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp117-160, 1988.
- Moore DE, Foy HM, Daling JR, Grayston JT, Spadoni LR, Wang S-P, Kuo C-C & Eschenbach DA.** Increased frequency of serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* in tubal infertility due to distal tubal disease. Lancet ii: 574-577, 1982.
- Morisson RP, Belland RJ, Lyng K & Caldwell HD.** Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. J exp Med 170: 1271-1283, 1989.
- Morre SA, Sillekens PTG, Jacobs MV, de Blok S, Ossewaarde JM, van Aarle P, van Gemen B, Walboomers JMM, Meijer CJL & van den Brule AJC.** Monitoring of *Chlamydia trachomatis* infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence based amplification. J Clin Pathol Mol Pathol 51: 149-154, 1998a.
- Morre SA, Ossewaarde JM, Lan J, van Doornum GJ, Walboomers JM, MacLaren DM, Meijer CJ & van den Brule AJ.** Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G, and J as confirmed by *omp1* nucleotide sequence analysis. J Clin Microbiol 36: 345-351, 1998b.
- MortimerPG and Piddock LJ.** The accumulation of five agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 32: 195-213, 1993.

- Moulder JW, Hatch TP, Kuo C-C, Schachter J & Storz J.** Genus *Chlamydia*. Jones, Rake and Stearns 1945, pp. 729-735. In Krieg NR et al. (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp 729-739, 1984.
- Moulder JW.** Characteristics of *Chlamydiae*. In Barron AL (ed). Microbiology of *Chlamydia*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp 3-19, 1988.
- Moulder JW.** Interaction of *Chlamydiae* and host cells *in vitro*. Microbiol Rev 55: 143-190, 1991.
- Mourad A, Sweet RL, Sugg N & Schachter J.** Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob Agents Chemother 18: 696-698, 1980.
- Munoz MG, Jeremias J & Witkin SS.** The 60 kDa heat shock protein in human semen: relationship with antibodies to spermatozoa and *Chlamydia trachomatis*. Hum Reprod 11: 2600-2603, 1996.
- Murdoch MB and Peterson LR.** Antimicrobial penetration into polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages. Semin Respir Infect 6: 112-121, 1991.
- Nacucchio MC, Bellora MJ, Sordelli DO & D'Aquino M.** Enhanced liposome-mediated activity of piperacillin against staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 27: 137-139, 1985.
- Nacucchio MC, Gatto Bellora MJ, Sordelli DO & D'Aquino M.** Enhanced liposome-mediated antibacterial activity of piperacillin and gentamicin against gram-negative bacilli *in vitro*. J Microencapsul 5: 303-309, 1988.
- Naeff R, Pliska V & Weder HG.** Pharmacokinetics of small unilamellar liposomes and incorporated lonazolac after i.m. administration. J Microencapsul 7: 95-103, 1990.
- Najar I, Oberti J, Teyssier J & Caravano R.** Kinetics of the uptake of rifampicin and tetracycline into mouse macrophages. Path Biol 32: 85-89, 1984.
- Nikaido H.** The outer membrane of Gram-negative bacteria. Adv Microb Phys 20: 163-250, 1970.
- Nakata K, Maeda H, Fujii A, Arakawa S, Umezu K & Kamidono S.** *In vitro* and *in vivo* activities of sparfloxacin, other quinolones, and tetracyclines against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob Agents Chemother 36: 188-190, 1992.

- New RRC.** Influence of liposome characteristics on their properties and fate. *In* Philippot JR, Schuber F (eds). Liposomes as tools in basic research and industry. CRC Press. Boca Raton, FL, pp 3-20, 1995.
- Newhall V WJ.** Macromolecular and antigenic composition of *Chlamydiae*. *In* Barron AL (ed). Microbiology of *Chlamydia*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp 47-70, 1988.
- Newhall V WJ, Batteiger B & Jones RB.** Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 38: 1181-1189, 1982.
- Nightingale SD, Saletan SL, Swenson CE, Lawrence AJ, Watson DA, Pilkiewicz FG, Silverman EG & Cal SX.** Liposome-encapsulated gentamicin treatment of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1869-1872, 1993.
- Nikaido H, Song SA, Shaltiel L & Nurminen M.** Outer membrane of Salmonella XIV. Reduced transmembrane diffusion rates in porin-deficient mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 76: 324-330, 1976.
- Nikaido H & Thanassi DG.** Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1393-1399, 1993.
- Nishiya T & Chang TM.** Toxicity of liposomes containing low mol% of dioleoyl phosphocholine to blood: use of carboxymethyl chitin to reduce toxicity. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 883-888, 1994.
- Numazaki K.** Serological tests for *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 11: 228-229, 1998.
- Numazaki K, Suzuki K & Chiba S.** Replication of *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae* in the human monocytic cell line U-937. *J Med Microbiol* 42: 191-195, 1995.
- Nurminen M, Rietschel ET & Brade H.** Chemical characterization of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 48: 573-575, 1985.
- Odeh M & Oliven A.** Chlamydial infections of heart. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 885-893, 1992.
- O'Farrell N, Hoosen AA, Coetzee KD & van den Ende J.** Genital ulcer disease in men in Durban, South Africa. *Genitourin Med* 67: 327-330, 1991a.

- O'Farrell N, Hoosen AA, Coetzee KD & van den Ende J.** Genital ulcer disease in women in Durban, South Africa. *Genitourin Med* 67: 322-326, 1991b.
- Oh YK, Nix DE & Straubinger RM.** Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2104-2111, 1995.
- Oldfield E & Chapman D.** Effects of cholesterol and cholesterol derivatives on hydrocarbon chain mobility in lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 610-616, 1971.
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ & Papahadjopoulos D.** Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557: 9-23, 1979.
- Omri A, Beaulac C, Bouhajib M, Monplaisir S, Sharkawi M & Lagace J.** Pulmonary retention of free and liposome-encapsulated after intratracheal administration in uninfected rats and rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1090-1095, 1994.
- Omri A & Ravaoarinoro M.** Les liposomes: intérêts et limites en pharmacologie dans la thérapeutique des infections bactériennes. *Can J Clin Pharmacol* 5: 231-241, 1998.
- Omri A, Ravaoarinoro M & Poisson M.** Incorporation, release and in-vitro antibacterial activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 36: 631-639, 1995.
- OMS.** Cécité et déficience visuelle. Partie II: principale causes dans le monde. Aide-mémoire N° 143, 1997.
- OMS.** Initiative mondiale pour l'élimination de la cécité évitable (2). Vision 2020, le droit à la vue. Aide-mémoire N° 214, 1999.
- ONUSIDA/OMS.** Les maladies sexuellement transmissibles: politiques et principes de prévention et de soins. pp 1-47, 1997.
- Onyeji CO, Nightingale CH & Marangos MN.** Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome-entrapped vancomycin and teicoplanin. *Infection* 22: 338-342, 1994a.
- Onyeji CO, Nightingale CH, Nicolau DP & Quintiliani R.** Efficacies of liposome-encapsulated clarythromycin and ofloxacin against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 523-527, 1994b.

- Oriel JD & Ridgway GL.** Epidemiology of chlamydial infection of the human genital tract: evidence for existence of latent infections. *Eur J Clin Microbiol* 1: 69-75, 1982.
- Ostro MJ.** Liposomes. *Sci Am* 256: 102-111, 1987.
- Paguirigan AM, Byrne GI, Becht S & Carlin JM.** Cytokine-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase induction in response to *Chlamydia* infection in human macrophage cultures. *Infect Immun* 62: 1131-1136, 1994.
- Pal S, Fielder TJ, Peterson EM & De La Maza LM.** Analysis of the immune response in mice following intrauterine infection with the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis biovar. *Infect Immun* 61: 772-776, 1993.
- Pal S, Hui W, Peterson HM & De La Maza LM.** Factors influencing the induction of infertility in a mouse model of *Chlamydia trachomatis* ascending genital infection. *J Med Microbiol* 47: 599-605, 1998.
- Pal S, Peterson EM & De La Maza LM.** A murine model for the study of *Chlamydia trachomatis* genital infections during pregnancy. *Infect Immun* 67: 2607-2610, 1999.
- Pal S, Theodor I, Petersen EM & De La Maza LM.** Immunization with an acellular vaccine consisting of the outer membrane complex of *Chlamydia trachomatis* induces protection against a genital challenge. *Infect Immun* 65: 3361-3369, 1997.
- Palmer L & Falkows S.** A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 16: 52-62, 1986.
- Panzner EA & Jansons VK.** Control of in vitro cytotoxicity of positively charged liposomes. *J Cancer Res Clin Oncol* 95: 29-37, 1979.
- Pao CC, Kao S-M, Wang H-C & Lee CC.** Intraamniotic detection of *Chlamydia trachomatis*. *Am J Obstet Gynecol* 164: 1295-1299, 1991.
- Papahadjopoulos D & Gabizon AA.** Sterically stabilized (Stealth[®]) liposomes: pharmacological properties and drug carrying potential in cancer. *In* Philippot JR, Schuber F (eds). *Liposomes as tools in basic research and industry*. CRC Press. Boca Raton, FL, pp 177-188, 1995.
- Papahadjopoulos D & Watkins JC.** Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated lipid crystals. *Biochem Biophys Acta* 135 : 624-638, 1967
- Park JK & Dow RC.** The uptake and localization of tetracycline in human blood cells. *Br J Exp Path* 51: 179-182, 1970.

- Parnham MJ & Wetzig H.** Toxicity screening of liposomes. *Chem Phys Lipids* 64: 263-274, 1993.
- Patton DL, Cosgrove YT, Kuo C-C & Campbell LA.** Effects of quinolone analog CI-960 in a monkey model of *Chlamydia trachomatis* salpingitis. *Antimicro Agents Chemother* 37: 8-13, 1993.
- Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Bohannon NJ, Clark AM, Hugues JP, Cappuccio A, Campbell LA & Stamm WE.** Effects of doxycycline and antiinflammatory agents on experimentally induced chlamydial upper genital tract infection in female macaques. *J Infect Dis* 175: 648-654, 1997.
- Patton DL, Cosgrove Sweeney YT & Kuo C-C.** Demonstration of delayed hypersensitivity in *Chlamydia trachomatis* salpingitis in monkeys: a pathogenic mechanism of tubal damage. *J Infect Dis* 169: 680-683, 1994.
- Patton DL, Halbert SA & Wang S-P.** Experimental salpingitis in rabbits provoked by *Chlamydia trachomatis*. *Fertil Steril* 37: 691-700, 1982.
- Patton DL & Rank RG.** Animal models for the study of pelvic inflammatory disease. In Quinn TC (ed). *Sexually transmitted diseases*. Raven Press Ltd, New York, pp 85-111, 1992.
- Pedersen LB, Birkelund S & Christiansen G.** Purification of recombinant *Chlamydia trachomatis* histone H1-like proteins Hc2, and comparative functional analysis of Hc2 and Hc1. *Mol Microbiol* 20: 295-311, 1996.
- Peeling RW, Bailey RL, Conway DJ, Holland MJ, Campbell AE, Jallow O, White HC & Mabey DC.** Antibody response to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma. *J Infect Dis* 177: 256-259, 1998.
- Peeling RW & Brunham RC.** Neutralization of *Chlamydia trachomatis* kinetics and stoichiometry. *Infect Immun* 59: 2624-2630, 1991.
- Peeling RW & Brunham RC.** *Chlamydiae* as pathogens: new species and new issues. *Emerg Infect Dis* 2: 307-319, 1996.
- Peeling RW, Kimani J, Plummer F, Maclean I, Cheang M, Bwayo J & Brunham RC.** Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis* 175: 1153-1158, 1997.

Pejaver SK. Role of liposome composition on drug stability. *In* Gregoriadis G (ed). Liposome technology, 2nd edition, vol II. Entrapment of drugs and other materials. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 275-292, 1993.

Perkins WR, Minchey SR, Ahl PL & Janoff AS. The determination of liposomes captured volume. *Chem Phys Lipids* 64: 197-217, 1993.

Peterson EM, Markoff BA, Schachter J & De La Maza LM. The 7,5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid* 23: 144-148, 1990.

Pettersson B, Andersson A, Leitner T, Olsvik Ø, Uhlen M, Storey C & Black CM. Evolutionary relationship among members of the genus *Chlamydia* based on 16S ribosomal DNA analysis. *J Bacteriol* 179: 4195-4205, 1997.

Philippot JR, Milhaud PG, Puyal CO & Wallach DFH. Non-phospholipid molecules and modified phospholipid components of liposomes. *In* Philippot JR, Schuber F (eds.). Liposomes as tools in basic research and industry. CRC Press. Boca Raton, FL, pp 41-57, 1995.

Phillips DM and Burillo CA. Ultrastructure of the murine cervix following infection with *Chlamydia trachomatis*. *Tissue & Cell* 30: 446-452, 1998.

Phillips NC, Skamene E & Tsoukas C. Liposomal encapsulation of 3'-azido- 3'-deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immunosuppression. *J AIDS* 4: 959-966, 1991.

Popescu MC, Swenson CE & Ginsberg RS. Liposome-mediated treatment of viral, bacterial, and protozoal infections. *In* Ostro MJ (ed). Liposomes. From biophysics to therapeutics. Marcel Dekker Inc. New York, , pp 219-251, 1987.

Puisieux F & Poly PA. Problèmes technologiques posés par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses. Encapsulation, stérilisation, conservation. Dans Puisieux F, Delattre J (éds). Les liposomes: applications thérapeutiques. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, pp 73-113, 1985.

Puy H, Fuentes V, Eb F & Orfila J. Caractères biochimiques et structure antigénique des *Chlamydia*. *Ann Biol Clin* 47: 485-491, 1989.

Quinn TC, Kappus EW & James SP. The immunopathogenesis of lymphogranuloma venereum rectal infection in primates. *In* Oriel D, Ridgway G, Schachter J, Taylor-Robinson

D and Ward M (eds). Chlamydial infections. Cambridge University Press, Cambridge, pp 404-407, 1986.

Qureshi N, Kaltashov I, Walker K, Doroshenko V, Cotter RJ, Takayama K, Sievert TR, Rice PA, Lin J-SL & Golenbock D. Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of *Chlamydia trachomatis*. J Biol Chem 272: 10594-10600, 1997.

Rahman YE. Use of liposomes in metal poisonings and metal storage diseases. In Gregoriadis G (ed). Liposomes as drug carriers. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, , pp 485-495, 1988.

Ramsey KH, Newhall V WJ & Rank RG. Humoral immune response to chlamydial genital infection of mice with agent of mouse pneumonitis. Infect Immun 57: 2441-2446, 1989.

Ramsey KH & Rank RG. Resolution of chlamydial genital infection with antigen-specific T - lymphocyte lines. Infect Immun 59: 925-931, 1991.

Rank RG. Animal models for urogenital infections. *Methods Enzymol* 235: 83-93, 1994.

Rank RG & Bavoil PM. Prospects for a vaccine against *Chlamydia* genital disease. II.- Immunity and vaccine development. Bull Inst Pasteur 94: 55-82, 1996.

Rank RG & Sanders MM. Pathogenesis of endometritis and salpingitis in a guinea pig model of chlamydial genital infection. Am J Pathol 140: 927-936, 1992.

Rank RG, Sanders MM & Kidd AT. Influence of the estrus cycle on the development of upper genital tract pathology as a result of chlamydial infection in the guinea pig model of pelvic inflammatory disease. Am J Pathol 142: 1291-1296, 1993.

Raulston JE. Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions. Mol Microbiol 15: 607-616, 1995.

Raulston JE, Davis CH, Schmiel DH, Morgan MW & Wyrick PB. Molecular characterization and outer membrane associaton of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp70 family of proteins. J Biol Chem 268: 23139-23147, 1993.

Raulston JE, Paul TR, Knight ST & Wyrick PB. Localization of *Chlamydia trachomatis* heat shock proteins 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell ligne in vitro. Infect Immun 66: 2323-2329, 1998.

- Ravaoarino M & Toma E.** Les liposomes, dans le traitement des infections. *Ann Med Interne* **144**: 182-187, 1993.
- Ravaoarino M, Toma E, Agbaba O & Morisset R.** Efficient entrapment of amikacin and teicoplanin in liposomes. *J Drug Targ* **1**: 191-195, 1993.
- Ray A & Newton V.** Use of high-performance liquid chromatography to monitor stability of tetracycline and chlartetracycline in susceptibility determinations. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1264-1266, 1991.
- Redziniak G, Perrier P & Marechal C.** Liposome at the industrial scale. In Philippot JR and Schuber F (eds). *Liposomes as tools in basic research and industry*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp 59-67, 1995.
- Ridderhof JC & Barnes RC.** Fusion of inclusions following superinfection of HeLa cells by two serovars of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* **57**: 3189-3193, 1989.
- Ridgway GL.** Treatment of chlamydial genital infection. *J Antimicrob Chemother* **40**: 311-314, 1997.
- Ridgway GL, Owen JM & Oriel JD.** A method for testing the antibiotic susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in a cell culture system. *J Antimicrob Chemother* **2**: 71-76, 1976.
- Rietschel ET, Brade L, Holst O, Kulshin VA, Lindner B, Moran AP, Schade UF, Zähringer U & Brade H.** Molecular structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. In Nowotny A, Spitzer JJ, Ziegler EJ (eds). *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*. Proceedings of the 1st congress of the international endotoxin society, San Diego, 9-12 may 1990. *Experta Medica*, New York, pp15-32, 1990.
- Roberts MC.** Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 1-24, 1996.
- Robinson AJ, Watkeys JEM & Ridgway GL.** Sexually transmitted organisms in sexually abused children. *Arch Dis Child* **79**: 356-358, 1998.
- Rodriguez P, Allardet-Servent A, De Barbeyrac B, Ramuz M & Bebear C.** Genetic variability among *Chlamydia trachomatis* reference and clinical strains analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **32**: 2921-2928, 1994.
- Roesler J, Hockertz S, Vogt B & Lohmann-Matthes ML.** Staphylococci surviving intracellularly in phagocytes from patients suffering from chronic granulomatous disease

are killed in vitro by antibiotics encapsulated in liposomes. *J Clin Invest* 88: 1224-1229, 1991.

Saivin S & Houin G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clin Pharmacokinet* 15: 335-366, 1988.

Sanders LL, Harrison HR & Washington AE. Treatment of sexually transmitted chlamydial infections. *JAMA* 255: 1750-1756, 1986.

Sanderson NM & Jones MN. Encapsulation of vancomycin and gentamicin within cationic liposomes for inhibition of growth of *Staphylococcus epidermidis*. *J Drug Target* 4: 181-189, 1996.

Sangaré L, Morisset R, Omri A & Ravaoarino M. Incorporation rates, stabilities, cytotoxicities and release of liposomal tetracycline and doxycycline in human serum. *J Antimicrob Chemother* 42: 831-834, 1998.

Sangaré L, Morisset R & Ravaoarino M. In-vitro anti-chlamydial activities of free and liposomal tetracycline and doxycycline. *J Med Microbiol* 48: 689-693, 1999a.

Sangaré L, Morisset R & Ravaoarino M. Inhibition in-vitro de la croissance de *Chlamydia trachomatis* par des cyclines encapsulées dans les liposomes. *Path Biol*, 1999b (soumis).

Sangaré L, Manafi N, Agbaba O, Morisset R & Ravaoarino M. Liposomal erythromycin and doxycycline: encapsulation rates, stability and release in human serum. Abstract n° A-148, p 26. 97th ASM General meeting. Miami Beach, Florida; May 4-8, 1997.

Sangaré L, Morisset R & Ravaoarino M. Use of high-performance liquid chromatography and bioassay to study liposome-encapsulated cyclines. Poster n° A 15. 99th ASM General meeting. Chicago. Illinois; May 30-June 3, 1999c.

Sarov I, Geron E, Shemer-Avni Y, Manor E, Zvillich M, Wallach D, Schmitz E & Holtman H. Implications for persistent chlamydial infection of phagocyte-microorganism interplay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 119-123, 1991.

Schachter J. Chlamydial infections. *N Engl J Med* 298: 428-435, 490-495, 540-549, 1981.

Schachter J. Overview of human diseases. In Barron AL (ed). *Microbiology of Chlamydia*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 153-165, 1988.

Schachter J. Pathogenesis of chlamydial infections. *Pathol Immunopathol Res* 8: 206-220, 1989.

- Schachter J.** Chlamydial infections. *West J Med* 153: 523-534, 1990.
- Schachter J & Dawson CR.** The epidemiology of trachoma predicts more blindness in the future. *Scand J Infect Dis, Suppl* 69: 55-62, 1990.
- Schnappinger D & Hillen W.** Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol* 165: 359-369, 1996.
- Schramm N & Wyrick PB.** Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. *Infect Immun* 63: 324-332, 1995.
- Sheehan DJ, Hitchcock CA & Sibley CM.** Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 40-70, 1999.
- Shepard MK & Jones RB.** Recovery of *Chlamydia trachomatis* from endometrial and fallopian tube biopsies in women with infertility of tubal origin. *Fertil Steril* 52: 232-238, 1989.
- Shinozawa S, Araki Y & Oda T.** Distribution of [³H] prednisolone entrapped in lipid layer of liposome after intramuscular administration in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 24: 223-232, 1979.
- Sinai AP & Joiner KA.** Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Ann Rev Microbiol* 51: 415-462, 1997.
- Slack MPE & Nichols WW.** Antibiotic penetration through bacterial capsules and exopolysaccharides. *J Antimicrob Chemother* 10: 368-372, 1982.
- Smith HW.** Antibiotics in animal feeds. *J Sci Food Agric* 29: 79, 1978.
- Speer BS, Bedzyk L & Salyers AA.** Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol* 173: 176-183, 1991.
- Speer BS & Salyers AA.** Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170: 1423-1429, 1988.
- Speer BS & Salyers AA.** Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J Bacteriol* 171: 148-153, 1989.
- Speer BS, Shoemaker NB & Salyers AA.** Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 5: 387-399, 1992.
- Sriprakash KS & MacAvoy ES.** Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 18: 205-214, 1987.

- Stagg AJ, Tuffrey M, Woods C, Wunderink E & Knight SC.** Protection against infection of the genital tract by *Chlamydia trachomatis* is associated with recruitment of the major histocompatibility complex class II antigen - presenting cells into uterine tissue. *Infect Immun* 66: 3535-3544, 1998.
- Stamm WE.** Azithromycin in the treatment of uncomplicated genital chlamydial infections. *Am J Med* 91 (Suppl 3A): 3A-19s - 3A-22s, 1991.
- Stamm WE.** *Chlamydia trachomatis* infections: progress and problems. *J Infect Dis* 179 (Suppl 2): s380-s383, 1999.
- Starnbach MN, Bevan MJ & Lampe MF.** Murine cytotoxic T lymphocytes induced following *Chlamydia trachomatis* intraperitoneal or genital tract infection respond to cells infected with multiple serovars. *Infect Immun* 63: 3527-3530, 1995.
- Steinberg TH.** Cellular transport of drugs. *Clin Infect Dis* 19: 916-921, 1994.
- Stephens RS.** Molecular genetics of *Chlamydia*. In Bowie WR, Caldwell HD, Jones RB, Mardh P-A, Ridgway GL, Schachter J, Stamm WE, Ward ME (eds). *Chlamydial infections. Proceedings of the seventh International Symposium on human chlamydial infections.* Harrison Hot Springs, British Columbia, Canada: 24-29 June 1990. Cambridge University Press, Cambridge, pp 63-72, 1990.
- Stephens RS.** Chlamydial genetics. In Barron AL (ed). *Microbiology of Chlamydia*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp 111-134, 1988.
- Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV & Davis RW.** Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282: 754-759, 1998.
- Stephens RS, Mullenbach G, Sanchez-Pescador R & Agabian N.** Sequence analysis of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar L₂. *J Bacteriol* 168: 1277-1282, 1986.
- Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C & Urdea MS.** Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 169: 3879-3885, 1987.
- Stephens RS, Tam MR, Kuo C-C & Nowinski RC.** Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol* 128: 1083-1089, 1982.

- Stevenson M, Baillie AJ & Richards RM.** Enhanced activity of streptomycin and chloramphenicol against intracellular *Escherichia coli* in the J774 macrophage cell line mediated by liposome delivery. *Antimicrob Agents Chemother* 24: 742-749, 1983.
- Stocks NP, Newland H & Hiller J.** The epidemiology of blindness and trachoma in the Anangu Pitjantjatjara of South Australia. *Med J Aust* 160: 751-756, 1994.
- Stothard DR, Williams JA, van der Pol B & Jones RB.** Identification of *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. *Infect Immun* 66: 6010-6013, 1998.
- Su H, Feilzer K, Caldwell HD & Morrison RP.** *Chlamydia trachomatis* genital tract infection of antibody - deficient gene knockout mice. *Infect Immun* 65: 1993-1999, 1997.
- Su H, Messer R, Whitmire W, Fischer E, Portis JC & Caldwell HD.** Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with non viable *Chlamydiae*. *J Exp Med* 188: 809-818, 1998.
- Su H, Raymond L, Rockey DD, Fisher E, Hackstadt T & Caldwell HD.** A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11143-11148, 1996.
- Su H, Watkins NG, Zhang Y-X & Caldwell HD.** *Chlamydia trachomatis* host cell interactions: role of *Chlamydia* major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 58: 1017-1025, 1990.
- Su H, Zhang Y-X, Barrera O, Watkins NG & Caldwell HD.** Differential effect of trypsin on infectivity of *Chlamydia trachomatis*: loss of infectivity requires cleavage of major outer membrane protein variable domains II and IV. *Infect Immun* 56: 2094-2100, 1988.
- Sum PE, Lee VJ, Testa RT, Hlavka JJ, Ellestad GA, Bloom JD, Gluzman Y & Tally FP.** A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *J Med Chem* 37: 184-188, 1994.
- Swason AF & Kuo C-C.** Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect Immun* 62: 24-28, 1994.
- Swenson CE, Donegan E & Schachter J.** *Chlamydia trachomatis*-induced salpingitis in mice. *J Infect Dis* 148: 1101-1107, 1983.
- Swenson CE, Sung ML & Schachter J.** The effect of tetracycline treatment on chlamydial salpingitis and subsequent fertility in the mouse. *Sex Transm Dis* 13: 40-44, 1986.

- Szoka F, Olson F, Heath T, Vail W, Wayhew E & Papahadjopoulos D.** Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 601: 559-571, 1980.
- Szoka Jr F & Papahadjopoulos D.** Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4194-4198, 1978.
- T'ang F-F, Hsiao-Lou C, Yuan-T'ung H & K'o-Ch'ien W.** Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chin med J* 75: 429-447, 1957.
- Tabbara KF & Al-Omar OM.** Trachoma in Saudi Arabia. *Ophthalmic Epidemiol* 4: 127-140, 1997.
- Tadakuma T, Ikewaki N, Yasuda T, Tsutsumi M, Saito S & Saito K.** Treatment of experimental salmonellosis in mice with streptomycin entrapped in liposomes. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 28-32, 1985.
- Tally FT, Ellestad GA & Testa RT.** Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines. *J Antimicrob Chemother*, 35: 449-452, 1995.
- Tamura A, Matsumoto A & Higashi N.** Purification and chemical composition of reticulate bodies of the Meningopneumonitis organisms. *J Bacteriol* 93: 2003-2008, 1967.
- Terrell CL.** Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo Clin Proc* 74: 78-100, 1999.
- Testa RT, Petersen PJ, Jacobus NV, Sum PE, Lee VJ & Tally FP.** In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylcyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2270-2277, 1993.
- Thanassi DG, Suh GS & Nikaido H.** Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 998-1007, 1995.
- Thejls H, Gnarpe J, Lundkvist Ö, Heimer G, Larsson G & Victor A.** Diagnosis and prevalence of persistent *Chlamydia* infection in infertile women: tissue culture, direct antigen detection, and serology. *Fertil Steril* 55: 304-310, 1991.
- Theunissen JJH, Minderhoud-Bassie W, Wagenvoort JHT, Stolz E, Michel MF & Huikeshoven FJM.** *Chlamydia trachomatis*-specific antibodies in patients with pelvic inflammatory disease: comparison with isolation in tissue culture or detection with polymerase chain reaction. *Genitourin Med* 70: 304-307, 1994.

- Thompson SE & Washington AE.** Epidemiology of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* infections. *Epidemiol Rev* 5: 93-123, 1983.
- Ting LM, Haidaris CG & Bavoil PM.** Interactions of outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect Immun* 63: 3600-3608, 1995.
- Toomey KE & Barnes RC.** Treatment of *Chlamydia trachomatis* genital infection. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 6: s645-s655, 1990.
- Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Kindelan JM, Jurado R & Sanchez-Guijo P.** Successful treatment of antimony-resistant visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 17: 625-627, 1993.
- Toye B, Laferrière C, Claman P, Jessamine P & Peeling R.** Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility. *J Infect Dis* 168: 1236-1240, 1993.
- Trahovsky YS & Ivanitsky GR.** Liposomes in gene therapy. Structural polymorphism of lipids and effectiveness of gene delivery. *Biochemistry* 63: 607-618, 1998.
- Tseng C-T K & Rank RG.** Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection. *Infect Immun* 66: 5867-5875, 1998.
- Tuffrey M, Falder P, Gale J & Taylor-Robinson D.** Salpingitis in mice induced by human strains of *Chlamydia trachomatis*. *Br J Exp Path* 67:605-616, 1986.
- Tuffrey M, Falder P & Taylor-Robinson D.** Genital-tract infection and disease in nude and immunologically competent mice after inoculation of a human strain of *Chlamydia trachomatis*. *Br J Exp Path* 63: 539-546, 1982.
- Tuffrey M, Falder P & Taylor-Robinson D.** Reinfection of the mouse genital tract with *Chlamydia trachomatis*: the relationship of antibody to immunity. *Br J Exp Path* 65: 51-58, 1984.
- Tuffrey M & Taylor-Robinson D.** Progesterone as a key factor in the development of a mouse model for genital-tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett* 12: 111-115, 1981.
- Tuffrey M, Woods C, Inman C & Taylor-Robinson D.** The effect of a single oral dose of azithromycin on chlamydial salpingitis in mice. *J Antimicrob Chemother* 28: 741-746, 1991.

- Tuffrey M, Woods C, Inman C & Ward M.** The effect of a single oral dose of azithromycin on chlamydial infertility and oviduct ultrastructure in mice. *J Antimicrob Chemother* 34: 989-999, 1994.
- Tulkens PM.** Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 100-106, 1991.
- van den Broek PJ.** Antimicrobial drugs, microorganisms, and phagocytes. *Rev Infect Dis* 11: 213-245, 1989.
- Van Ooij C, Homola E, Kincaid E & Engel J.** Fusion of *Chlamydia trachomatis*-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis. *Infect Immun* 66: 5364-5371, 1998.
- Vanwaeyenbergh J.** Les infections à *Chlamydia trachomatis*. *Acta Urol Belg* 61: 145-151, 1993.
- Vidal M.** Méthodes de caractérisation des liposomes. Dans Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F (éds). *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Éditions INSERM et Tec & Doc-Lavoisier, Paris, pp 69-86, 1993.
- Villegas H, Pinon M, Shor V & Karchmer S.** Electron microscopy of *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract. *Arch Androl* 27: 117-126, 1991.
- Vizitiu O, Cracea E, Constantinescu S, Balaci L & Lazar M.** Epidemiology of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* infections in male patients. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 48: 209-214, 1989.
- Wang S-P & Grayston JT.** Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. *J Infect Dis* 130: 388-397, 1974.
- Wang S-P & Grayston JT.** Serotyping of *Chlamydia trachomatis* by indirect fluorescent-antibody staining of inclusions in cell culture with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 29: 1295-1298, 1990.
- Wang S-P & Grayston JT.** Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, and L_{2a}. *J Infect Dis* 163: 403-405, 1991.
- Wang S-P, Kuo C-C, Barnes RC, Stephens RS & Grayston JT.** Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 152: 791-800, 1985.
- Ward ME.** The chlamydial development cycle. In Barron AL (ed). *Microbiology of Chlamydia*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp 71-95, 1988.

- Ward ME.** Chlamydial vaccines-future trends. *J Infection* 25 Suppl I: 11-26, 1992.
- Ward ME.** The immunology and immunopathology of chlamydial infections. *APMIS* 103: 769-796, 1995.
- Ward M, Bailey R, Lesley A, Kajbaf M, Robertson J & Mabey D.** Persisting inapparent chlamydial infection in a trachoma endemic community in the Gambia. *Scand J Infect Dis* 69 Suppl: 137-148, 1990.
- Ward ME & Clarke IN.** New perspectives in chlamydial biology and development. *In* Bowie WR, Caldwell HD, Jones RB, Mardh P-A, Ridgway GL, Schachter J, Stamm WE, Ward ME (eds). Chlamydial infections. Proceedings of the seventh International Symposium on human chlamydial infections. Harrison Hot Springs, British Columbia, Canada: 24-29 June 1990. Cambridge University Press, Cambridge, pp3-14, 1990.
- Washington AE, Padian NS, Hearst N & Schachter J.** Risk of Chlamydial PID and oral contraceptives. *JAMA* 264: 2072-2073, 1990.
- Wassef NM & Alving CR.** Complement-dependent phagocytosis of liposomes. *Chem Phys Lipids* 64: 239-248, 1993.
- Webb MS, Boman NL, Wiseman DJ, Saxon D, Sutton K, Wong KF, Logan P & Hope MJ.** Antibacterial efficacy against an in vivo *Salmonella typhimurium* infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 45-52, 1998
- Weber JT & Johnson RE.** New Treatments for *Chlamydia trachomatis* genital infection. *Clin Infect Dis* 20 (Suppl 1): s66-s71, 1995.
- Weinstein JN.** Liposomes in the diagnosis and treatment of cancer. *In* Ostro MJ (ed). Liposomes. From biophysics to therapeutics. Marcel Dekker Inc, New York, pp 277-338, 1987.
- Weisburg WG & Hatch TP, Woese CR.** Eubacterial origin of *Chlamydiae*. *J Bacteriol* 167: 570-574, 1986.
- Wetröm L & Wölner-Hanssen P.** Pathogenesis of pelvic inflammatory disease. *Genitourin Med* 69: 9-17, 1993.
- White AG, Bogh J, Leheny W, Kuchipudi P, Varghese M, Al Riyami H, Al Hashmi S & Daar AS.** HLA antigens in Omanis with blinding trachoma: markers for disease susceptibility and resistance. *Br J Ophthalmol* 81: 431-434, 1997.

- Williams DM, Grubbs BG, Pack E, Kelly K & Rank RG.** Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 65: 2876-2882, 1997.
- Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P & Sprenger M.** Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. *BMJ* 317: 609-610, 1998.
- Witkin SS, Askienazy-Elbhar M, Henry-Suchet J, Belaisch-Allart J, Tort-Grumbach J & Sarjdine K.** Circulating antibodies to a conserved epitope of the *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein (hsp60) in infertile couples and its relationship to antibodies to *C. trachomatis* surface antigens and the *Escherichia coli* and human HSP60. *Hum reprod* 13: 1175-1179, 1998.
- Witkin SS, Kligman I & Bongiovanni AM.** Relationship between an asymptomatic male genital tract exposure to *Chlamydia trachomatis* and autoimmune response to spermatozoa. *Hum Reprod* 10: 2952-2955, 1995.
- Woodle MC.** Surface-modified liposomes: assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation. *Chem Phys Lipids* 64: 249-262, 1993.
- Wolff H.** The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63: 1143-1157, 1995.
- Wylie JL, Iliffe ER, Wang LL & McClarty G.** Identification, characterization, and development regulation of *Chlamydia trachomatis* 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO)-8-phosphate synthetase and CMP-KDO synthetase. *Infect Immun* 65: 1527-1530, 1997.
- Wyrick PB, Davis CH, Knight ST & Choong J.** In-vitro activity of azithromycin on *Chlamydia trachomatis* infected, polarized human endometrial epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 31: 139-150, 1993.
- Wyrick PB, Knight ST, Paul TR, Rank RG & Barbier CS.** Persistent chlamydial envelope antigens in antibiotic-exposed infected cells trigger neutrophil chemotaxis. *J Infect Dis* 179: 954-966, 1999.
- Yang YS, Kuo C-C & Chen W-J.** Reactivation of *Chlamydia trachomatis* lung infection in mice by cortisone. *Infect Immun* 39: 655-658, 1983.
- Yonga G.** Current drug therapy of systemic mycoses: a review. *East Afr Med J* 72: 394-398, 1995.
- Yoshihara E & Nakae T.** Cytolytic activity of liposomes containing stearylamine. *Biochim Biophys Acta* 854: 93-101, 1986.

- Yuan Y, Zhang Y-X, Watkins NG & Caldwell HA.** 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* 57: 1040-1049, 1989.
- Zana J, Muffat-Joly M, Thomas D, Orfila J, Salat-Baroux J & Pocidalo J-J.** Roxithromycin treatment of mouse chlamydial salpingitis and protective effect on fertility. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 430-435, 1991.
- Zana J, Thomas D, Muffat-Joly M, de Brux J, Pocidalo J-J, Orfila J, Carbon C & Salat-Baroux J.** An experimental model for salpingitis due to *Chlamydia trachomatis* and residual tubal infertility in the mouse. *Hum Reprod* 5: 272-278, 1990.
- Zbinden G, Wunderli-Allenspach H & Grimm L.** Assessment of thrombogenic potential of liposomes. *Toxicology* 54: 273-280, 1989.
- Zhang JP & Stephens RS.** Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* 69: 861-869, 1992.
- Zhang SY, Zou LH, Gao YQ, Di Y & Wang XD.** National epidemiological survey of blindness and low vision in China. *Chin Med J* 105: 603-608, 1992a.
- Zelin JM, Robinson AJ, Ridgway GL, Allason-Jones E & Williams P.** Chlamydial urethritis in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change. *Int J STD AIDS* 6: 27-30, 1995.
- Zhong G & Brunham RC.** Antibody responses to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 are *H-2* linked. *Infect Immun* 60: 3143-3149, 1992.
- Zierenberg O & Betzing H.** Pharmacokinetics and metabolism of i.m. injected polyenylphosphatidyl choline liposomes. *Arzneim Forsch* 29: 494-498, 1979.