

Université de Montréal

CARACTÉRISATION ET ACTIVITÉ DES ANTIMICROBIENS
SOUS FORME LIBRE ET LIPOSOMALE SUR DES
INFECTIONS AIGUËS ET PERSISTANTES À
CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN VITRO

par

Daniel Stanley Rivas Deleon

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie et Immunologie

Janvier, 2001

©Daniel Stanley Rivas Deleon



W
4
2158
2001
N. 097

Identification du jury

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

CARACTÉRISATION ET ACTIVITÉ DES ANTIMICROBIENS
SOUS FORME LIBRE ET LIPOSOMALE SUR DES
INFECTIONS AIGÜES ET PERSISTANTES À
CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN VITRO

présenté par :

Daniel Stanley Rivas Deleon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Carolina ALFIERI
Directeur de recherche : Madeline RAVASARINO RO
Membre du jury : Jocelyn YELLE

Mémoire accepté le : 26.04.2001

Sommaire

Chlamydia trachomatis, est un des principaux agents bactériens des maladies sexuellement transmissibles (MTS).

Les chlamydioses constituent un problème majeur de santé publique, en effet 50 à 70% des infections chez la femme sont asymptomatiques et elles peuvent être une source d'infections pour les partenaires sexuels. Une haute proportion des personnes infectées manifestent des infections à répétition. Il existe plusieurs évidences qui laissent penser que *C. trachomatis* est capable de causer des infections persistantes pendant des mois et même des années en absence de traitement.

Plusieurs cas d'infections persistantes ont été rapportés malgré un traitement d'antibiotique adapté et bien suivi, laissant supposer la persistance de particules intracellulaires à l'état latent inaccessibles aux antibiotiques.

Toutes ces données nous incitent à évaluer l'activité des antichlamydiens liposomaux sur un modèle cellulaire in vitro d'infection persistante à *C. trachomatis*. Pour ce faire, l'IFN- γ a été utilisé pour induire la persistance.

En effet, l'IFN- γ est connu comme étant un facteur induisant la persistance in vitro.

En premier lieu nous avons voulu savoir si tous les sérotypes chlamydiens peuvent être induits dans un état de persistance en utilisant l'IFN- γ comme agent inducteur.

Alors, nous avons caractérisé trois sérotypes chlamydiens ayant des pouvoirs pathogènes différents : le sérotype A (responsable du trachome), le sérotype D (responsable des infections oculaires et génitales) et le sérotype L2 (responsable de la lymphogranulomatose humaine).

Nos résultats ont montré que tant au niveau de leurs profils d'ADN plasmidique, de leurs profils des protéines de la membrane externe que de leur sensibilité à la

doxycycline, l'érythromycine et la rifampicine chacun des 3 sérotypes analysés possède des profils assez semblables.

On remarque que la doxycycline sous forme liposomale possède une activité inhibitrice supérieure sur la croissance chlamydienne par rapport à sa forme libre. (Tableau X).

La doxycycline liposomale agit à une concentration 2 fois inférieure à celle de l'antibiotique libre. La CMI de chacun des trois sérotypes est de 0,06 et 0,03 $\mu\text{g/ml}$ pour la doxycycline libre et liposomale respectivement, la valeur de la CMB est de 0,12 et 0,06 $\mu\text{g/ml}$ pour les sérotypes A et D pour la doxycycline libre et liposomale respectivement tandis qu'elle est de 1,0 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$ pour le sérotype L2 pour la doxycycline libre et liposomale respectivement.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié une série de paramètres afin de développer un modèle de persistance chlamydienne in vitro. Le modèle établi par Beatty et coll., (1993), a été utilisé avec quelques modifications.

L'effet de la taille de l'inoculum, de la concentration d'IFN- γ , du prétraitement des feuillettes cellulaires avant l'infection par l'IFN- γ , de la durée du traitement ainsi que l'effet du cycloheximide sur le développement de la persistance induite par l'IFN- γ in vitro ont été investigués.

De ces études, il en ressort que ni la taille, ni le prétraitement des feuillettes cellulaires, ni la durée du traitement à l'IFN- γ n'avaient un effet sur le développement de la persistance in vitro, par contre la concentration d'IFN- γ et la présence du cycloheximide dans le milieu de croissance ont eu un effet marqué sur l'induction de la persistance par l'IFN- γ .

Des concentrations élevées d'IFN- γ ont inhibé la croissance chlamydienne alors que des concentrations faibles d'IFN- γ (0,2 à 0,5 ng/ml) ont induit la formation de formes intracellulaires persistantes.

De plus le développement de la persistance induite par le traitement à l'IFN- γ est dépendant de la synthèse protéique de la cellule hôte car la présence du cycloheximide dans le milieu de culture bloquait l'action de l'IFN- γ . Par ailleurs, l'état de persistance a pu être induit par le traitement à l'IFN- γ chez le sérotype A mais non chez les sérotypes D et L2.

Le traitement des cellules infectées par *C. trachomatis* sérotype A à l'IFN- γ a donné naissance à des formes élargies atypiques, non infectieuses, distinctes des corps élémentaires et des corps réticulés.

Enfin, la sensibilité à la doxycycline sous forme libre et sous forme liposomale pour la souche chlamydienne de sérotype A que nous avons induit persistant par traitement à l'IFN- γ a été déterminée. Il s'est avéré que le sérotype A persistant était plus résistant aux antibiotiques que le sérotype A à l'état sauvage avec des CMI supérieures à 8,0 $\mu\text{g/ml}$. Des inclusions chlamydiennes ont été détectées à même des concentrations élevées de doxycycline sous forme libre ou liposomale de 8,0 $\mu\text{g/ml}$. Une meilleure activité antichlamydienne de la doxycycline sous forme liposomale a été observée. Cette dernière exerce une activité inhibitrice 10 fois supérieure à celle de la doxycycline sous forme libre.

Table des matières

Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xvi
Liste des abréviations	xviii
Dédicace	xxii
Remerciements	xxiii
Introduction	1
1. Revue bibliographique	5
1.1 Généralités	5
1.1.1 Historique	5
1.1.2 Taxonomie et classification	6
1.1.3 Importance médicale	8
1.1.3.1 Généralités	8
1.1.3.2 Le trachome	8
1.1.3.3 Les maladies sexuellement transmissibles (MTS)	10
1.1.3.3.1 Les infections urogénitales	10
1.1.3.3.2 La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)	11
1.1.3.4 Épidémiologie	12
1.1.4 Caractéristiques de la bactérie	13
1.1.4.1 Structure et propriétés des corps élémentaires	15
1.1.4.2 Structure et propriétés des corps réticulés	15
1.1.4.3 Structure antigénique de <i>C. trachomatis</i>	16

1.1.5 Protéines de la membrane externe	16
1.1.5.1 Généralités	16
1.1.5.2 Protéine majeure de la membrane externe (MOMP)	18
1.1.5.3 Caractéristiques biochimiques	18
1.1.5.4 Rôle dans la structure de la bactérie.....	19
1.1.5.5 Rôle de la MOMP dans le cycle de développement	20
1.1.5.6 Variabilité antigénique et génétique de la MOMP.....	20
1.1.5.7 La protéine de stress (heat shock protéine : Hsp60)	21
1.1.5.8 Implication de la hsp60 dans la pathogénèse des infections à <i>C. trachomatis</i>	22
1.1.5.9 Autres protéines	23
1.1.6 Le lipopolysaccharide chlamydien (LPS)	24
1.1.7 ADN plasmidique	25
1.1.8 Culture cellulaire.....	25
1.1.9 Milieux de culture	27
1.1.10 Cycle de développement	28
1.1.10.1 Effet de la multiplication sur la cellule hôte	29
1.1.11 Altération du cycle de développement : notion de persistance.....	30
1.1.11.1 Généralités	30
1.1.11.2 Persistance induite par une déficience en nutriments	31
1.1.11.3 Agents antimicrobiens et persistance	32
1.1.11.4 Persistance induite par des facteurs d'ordre immunitaire	33
1.1.11.4.1 Interféron gamma et persistance	33
1.1.11.4.2 Le facteur nécrosant des tumeurs alfa (FNT- α) et persistance	37
1.1.11.5 Évidence de l'existence des souches persistantes in vitro	37
1.1.11.6 Évidence de l'existence des souches persistantes in vivo.....	38
1.1.11.7 Signification clinique	41

1.2 Facteurs de risque.....	42
1.3 Diagnostic bactériologique	42
1.3.1 Culture cellulaire.....	42
1.3.2 Test de détection des antigènes.....	43
1.3.2.1 Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	43
1.3.2.2 Immunofluorescence directe	44
1.3.3 Test de détection des acides nucléiques.....	44
1.3.3.1 Test d'hybridation d'acide nucléique (sondes d'ADN)	44
1.3.3.2 Diagnostic de <i>Chlamydia trachomatis</i> par PCR	45
1.4 Sensibilité aux antibiotiques	46
1.5 Traitement	47
1.6 Liposomes	49
1.6.1 Généralités	49
1.6.2 Définition	50
1.6.3 Propriétés	50
1.6.4 Classification.....	51
1.6.5 Méthodes de préparation des liposomes	51
1.6.6 Stabilité des liposomes.....	53
1.6.7 Dosage des antibiotiques encapsulés dans les liposomes	54
1.6.8 Les interactions liposomes-cellules	54
1.6.9 Toxicité des liposomes.....	55
1.6.10 Applications des liposomes.....	55
1.6.10.1 Applications des liposomes in vitro	55
1.6.10.2 Applications des liposomes in vivo	56
1.6.10.3 Autres applications des liposomes	57
1.6.11 Conclusion	58

Matériel et méthodes	59
2.1 Souches chlamydiennes	60
2.2 Souches cellulaires	60
2.3 Milieux de culture	61
2.4 Réactifs.....	61
2.4.1 Antibiotiques	61
2.4.2 Produits chimiques	62
2.4.3 Électrophorèse.....	64
2.4.3.1 Gel d'agarose	64
2.5 Appareils	65
2.6 Culture cellulaire.....	65
2.7 Trypsination des feuilletts confluents	66
2.7.1 Congélation et conservation des cellules	66
2.8 Culture et stockage des Chlamydiae	67
2.8.1 Culture des Chlamydiae sur cellules HeLa 229 dans des flacons de 75 cm ²	67
2.8.2 Culture des Chlamydiae sur cellules HeLa 229 sur plaque de 24 puits	68
2.8.3 Titrage des Chlamydiae	69
2.8.3.1 Calcul des unités formant inclusions (UFI)	70
2.9 Préparation de la doxycycline encapsulée dans les liposomes positifs.....	71
2.9.1 Préparation des liposomes.....	72
2.9.2 Détermination du taux d'antibiotique encapsulé dans les liposomes par la méthode microbiologique	73
2.9.2.1 Détermination de la courbe d'étalonnage	73
2.9.2.2 Solutions d'antibiotiques libérées des liposomes.....	73
2.9.2.3 Test microbiologique	74
2.10 Sensibilité des Chlamydiae aux antibiotiques.....	75

2.10.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) des antibiotiques sous forme libre et sous forme liposomale.....	75
2.10.2 Mise en évidence des inclusions chlamydiennes	76
2.10.2.1 Coloration des inclusions chlamydiennes par May-Grünwald-Giemsa.....	76
2.11 Purification des corps élémentaires chlamydiens	77
2.12 Extraction de l'ADN plasmidique.....	78
2.12.1 Technique d'isolation de l'ADN plasmidique	78
2.12.2 Électrophorèse de l'ADN plasmidique sur gel d'agarose	79
2.12.3 Estimation des poids moléculaires des plasmides.....	80
2.13 Analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens.....	80
2.13.1 Dosage des protéines chlamydiennes.....	80
2.13.1.1 Principe de la méthode	80
2.13.1.2 Courbe d'étalonnage	81
2.13.1.3 Dosage des protéines chlamydiennes totales par la microméthode	81
2.13.2 Analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens par SDS-PAGE	84
2.13.3 Coloration et décoloration des gels.....	84
2.13.4 Détermination des poids moléculaires des protéines	84
2.14 Établissement de l'infection persistante à <i>Chlamydia trachomatis</i>	85
2.14.1 Détermination des paramètres optimaux pour l'établissement de l'infection persistante.....	85
2.14.1.1 Taille de l'inoculum	85
2.14.1.2 Concentrations d'IFN- γ à tester	86
2.14.1.3 Traitement des feuillets cellulaires à infecter au préalable avec l'IFN- γ	86

2.14.1.4 Effet du cycloheximide sur le développement de la persistance induite par l'IFN- γ	87
2.14.2 Détermination de la concentration optimale d'IFN- γ induisant la forme persistante.....	87
2.14.3 Sensibilité des souches persistantes aux antibiotiques.....	88
2.14.4 Production des formes persistantes de <i>Chlamydia trachomatis</i>	89
2.14.5 Analyse des formes persistantes par SDS-PAGE	89
Résultats	90
3.1 Taux d'encapsulation de la doxycycline à l'intérieur des liposomes.....	91
3.2 Caractérisation des sérotypes de <i>C. trachomatis</i> étudiés	91
3.2.1 Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides des antibiotiques sous forme libre et sous forme liposomale.....	91
3.2.2 Analyse de l'ADN plasmidique de <i>C. trachomatis</i>	96
3.2.3 Analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens.....	97
3.3 Établissement de l'infection persistante par traitement à l'IFN- γ	98
3.4 Analyse des protéines totales du sérotype A induit persistant par traitement à l'IFN- γ ..	110
3.5 Activité de la doxycycline encapsulée sur les formes persistantes de <i>C. trachomatis</i>	110
3.6 Étude morphologique des cellules et des Chlamydiae au microscope optique.....	112
Discussion	114
Conclusion	132
Références	136
ANNEXE	165

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des différentes espèces de <i>Chlamydia</i>	7
Tableau II : Propriétés des biovars LGV et trachome de <i>C. trachomatis</i>	9
Tableau III : Différences biologiques entre les corps élémentaires et les corps réticulés de <i>Chlamydia trachomatis</i>	14
Tableau IV : Caractéristiques des principaux antigènes de <i>Chlamydia trachomatis</i>	17
Tableau V : Induction de la persistance chlamydienne par l'IFN γ	36
Tableau VI : Préparations des dilutions de la protéine standard (ASB).....	82
Tableau VII : Préparations des dilutions des protéines chlamydiennes.....	83
Tableau VIII : Activités des différents antibiotiques sur la croissance de 3 sérotypes de <i>Chlamydia trachomatis</i>	93
Tableau IX : Activité de la doxycycline sous forme libre et liposomale sur la croissance de 3 sérotypes de <i>Chlamydia trachomatis</i>	94
Tableau X : Nombre d'inclusions chlamydiennes détectées en présence des concentrations croissantes de doxycycline sous forme libre et liposomale après 72 h de contact avec l'antibiotique puis passage subséquent dans un milieu sans antibiotique (CMB).....	95
Tableau XI : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> sérotype A à un titre de 3×10^5 UFI/ml.....	100
Tableau XII : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> sérotype A à un titre de 3×10^5 UFI/ml.....	101
Tableau XIII : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> sérotype A à un titre de 4×10^4 UFI/ml.....	102
Tableau XIV : Effet du prétraitement des feuillettes cellulaires à l'IFN- γ et de la durée du traitement sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> sérotype A à un titre de 4×10^4 UFI/ml.....	104
Tableau XV : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> A à un titre de 4×10^4 UFI/ml en présence ou en absence de cycloheximide.....	105
Tableau XVI : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> A à un titre de 3×10^5 IFU/ml en présence ou en absence de cycloheximide.....	107

Tableau XVII : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> sérotype A à un titre de 3×10^5 IFU/ml.....	108
Tableau XVIII : Effet de l'IFN- γ sur la croissance de trois souches de <i>Chlamydia trachomatis</i> cultivées sur cellules HeLa 229 dans un milieu de croissance sans cycloheximide.....	109
Tableau XIX : Nombre d'inclusions chlamydiennes sous forme persistante détectées en présence de la doxycycline sous forme libre et liposomale (Inclusions/lamelle)...	111

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un corps élémentaire chlamydien.....	13-A
Figure 2 : Cycle de développement chlamydien.....	28-A
Figure 3 : Profils de l'ADN plasmidique des sérotypes A, D et L2 de <i>Chlamydia trachomatis</i>	96-A
Figure 4 : Profils des protéines totales des sérotypes A, D et L2 de <i>Chlamydia trachomatis</i> analysées par SDS-PAGE.....	97-A
Figure 5 : Comparaison des profils protéiques de <i>C. trachomatis</i> sérotype A à l'état persistant et le serotype A de type sauvage.....	110-A
Figure 6 : Cellules HeLa non infectées à l'état frais à un grossissement de 4X.....	113-A
Figure 7 : Cellules HeLa 229 infectées avec <i>C. trachomatis</i> sérotype L2, 48 h après l'infection, à l'état frais à un grossissement de 4X.....	113-A
Figure 8 : Cellules HeLa non infectées après coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400X.....	113-B
Figure 9 : Cellules HeLa infectées avec <i>C. trachomatis</i> sérotype L2, 48 h après l'infection puis coloration au MG Giemsa à un grossissement de 400X.....	113-B
Figure 10 : Cellules HeLa infectées avec <i>C. trachomatis</i> sérotype L2, 48 h après l'infection puis coloration au MG Giemsa à un grossissement de 400X.....	113-C
Figure 11 : Effet de la doxycycline sur la croissance de <i>C. trachomatis</i> sérotype A sur cellules HeLa 229, après 48 h de contact avec une concentration d'antibiotique de 0,015 µg/ml, puis coloration au MG Giemsa à un grossissement de 400X.....	113-C
Figure 12 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection aiguë, 48 h après l'infection puis coloration au MG Giemsa à un grossissement de 400X.....	113-D
Figure 13 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection aiguë, 48 h après l'infection puis coloration au MG Giemsa à un grossissement de 1000X.....	113-D
Figure 14 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection persistante, après traitement de <i>C. trachomatis</i> sérotype A avec 0,2 ng/ml d'IFN-γ puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400X.....	113-E
Figure 15 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection persistante, après traitement de <i>C. trachomatis</i> sérotype A avec 0,2 ng/ml d'IFN-γ puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 1000X.....	113-E

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
pb :	paire de bases
ASB :	albumine sérique bovine
°C :	degré celsius
CE :	corps élémentaire
cm :	centimètre
CO ₂ :	dioxyde de carbone
CMI :	concentration minimale inhibitrice
CMB :	concentration minimale bactéricide
CR :	corps réticulé
ddH ₂ O :	eau déionisée stérile
DEAE-dextran :	diéthylaminoéthyl-dextran
D.O :	densité optique
Dox :	doxycycline
EDTA :	acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA :	enzyme linked immunoadsorbent assay
g :	force centrifuge
h :	heures
HPLC :	high-performance liquid chromatography
Hsp 60 :	protéine de stress de 60 kilodalton
IFN- γ :	interféron gamma
kDa :	kilodalton
L :	litre
LGV :	lymphogranulomatose vénérienne
Lip+ :	liposome de charge positive

LPS :	lipopolysaccharide
M :	molaire
mA :	milliampère
mg :	milligramme
mL :	millilitre
mm :	millimètre
mM :	millimolaire
min :	minutes
MEMH :	milieu essentiel minimal avec sels de Hanks
MOMP :	protéine majeure de la membrane externe (Major Outer Membrane Protein)
nm :	nanomètre
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PBS :	tampon phosphate salin (phosphate-buffered saline)
PCR :	polymerase chain reaction
PID :	pelvic inflammatory diseases
p/v :	poids par volume
Rnase A :	ribonucléase A
rpm :	révolutions par minute
SPG :	tampon sucrose phosphate glutamate
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SFV :	sérum de veau fétal
TAE :	tris acétate
TEMED :	N,N,N'-tétra-méthyléthylène-diamine
TNF- α :	facteur nécrosant des tumeurs alpha
Tris :	hydroxyméthyl aminométhane

Ufi : unité formant inclusion

μg : microgramme

μL : microlitre

μM : micromolaire

v/v : volume/volume

V : volt

DÉDICACE

À mes grandes amours, mon épouse Ana Maria et à mes enfants Carol Anne et Daniel

À ma mère, à mon père et à mes frères et sœurs

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier de tout mon cœur ma directrice de recherche, la docteure Madeleine Ravaoarinoro, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour ses précieux conseils, pour sa grande disponibilité et pour son immense gentillesse.

Que Dieu vous bénisse pour tout ce que vous faites pour vos étudiants.

Je tiens à remercier aussi mon épouse, Annie, pour sa grande patience et pour avoir été toujours mon appui tout au long des mes études. Je t'aime.

Merci à mon créateur pour m'avoir donné la santé, la force, la persévérance et la patience pour réaliser ce travail.

Je voudrais également remercier les membres du jury, pour avoir eu la gentillesse de juger ce travail.

Je remercie aussi mes collègues de laboratoire : Sangaré Lassana, Amélie Tsama, Annie Chamberland et Christine Dos Santos pour notre amitié, pour la bonne entente et pour les agréables moments passés en leur compagnie.

Merci également à Monique Benoît, Rose-Marie Classens et à tout le personnel technique du Département de Microbiologie et Infectiologie de l'hôpital Hôtel-Dieu de Montréal pour leur accueil chaleureux.

Introduction

Chlamydia trachomatis est l'agent bactérien responsable de l'une des infections transmissibles sexuellement la plus répandues dans les pays industrialisés. L'Organisation Mondiale de la Santé a estimé à 89 millions le nombre d'infections à *C. trachomatis* déclarées en 1995 (World Health Organization, 1995).

Aux États-Unis, les infections à *C. trachomatis* sont les infections bactériennes les plus répandues avec approximativement 4 millions de cas par année chez les adolescents et les jeunes adultes (Washington et coll., 1987).

Chez l'homme, *C. trachomatis* est aussi responsable d'infections respiratoires et du trachome, maladie endémique qui touche plus de 500 millions d'individus à travers le monde et représente une cause majeure de cécité, avec environ 7 millions de cas au monde (Dawson et coll., 1981).

L'importance de l'infection à *C. trachomatis* s'explique essentiellement par les séquelles qu'elle occasionne chez la femme : maladie inflammatoire pelvienne (PID), stérilité tubaire, grossesse extra-utérine, et transmission de l'infection au nouveau-né (Vanwaeyenbergh, 1993). Chez l'homme les séquelles d'infection à *C. trachomatis* restent mineures et rares comparativement à celles observées chez la femme.

Les conséquences socio-économiques sont énormes : aux États-Unis les chlamydioses entraînent des dépenses estimées à 4 milliards de dollars par année (Stamm, 1999).

La lutte efficace contre ces infections nécessite un diagnostic précoce et une antibiothérapie dès la phase aiguë, pour interrompre la transmission à la communauté et prévenir les séquelles à long terme, malheureusement dans la plupart des cas et particulièrement chez la femme l'infection est asymptomatique à ce stade. Les chlamydioses constituent un problème de santé public, en effet 50 à 70% des infections chez la femme sont asymptomatiques et ces infections peuvent persister des mois et même des années et elles peuvent être transmises aux partenaires sexuels (Stamm, 1999).

La persistance est un facteur important de la pathogénèse chez les Chlamydiae. Des infections répétées pourraient jouer un rôle dans la stimulation de la réponse immunitaire et une augmentation des risques des dommages pathologiques (Batteiger et coll., 1989). Le terme persistance correspond à une association bactérie-hôte dans laquelle la bactérie est viable mais non cultivable (Barbeyrac et coll., 1997). In vitro des facteurs induisant la persistance ont pu être identifiés. Il s'agit d'antibiotiques (Cevenini et coll., 1988; Matsumoto et coll., 1970), des facteurs d'ordre nutritionnel (Allan et coll., 1989; Coles et coll., 1993) et immunitaire (Beatty et coll., 1993; Shemer-Avni et coll., 1989). Les formes persistantes sont atypiques et manifestent une modification d'expression d'antigènes chlamydiens avec une synthèse continue de la protéine de stress hsp60 et une réduction de la synthèse de la protéine majeure de la membrane externe (Beatty et coll., 1993).

Les individus atteints des maladies les plus sévères causées par *Chlamydia trachomatis* manifestent une réponse immunitaire élevée à l'égard de l'antigène commun chlamydien hsp60. Cette protéine partage 50% d'homologie avec celle trouvée chez l'humain. Il a été suggéré que par un mimétisme moléculaire, ces individus auraient une réponse contre la protéine hsp60 humaine provoquant des dommages inflammatoires auto-immuns responsables des dommages pathologiques (Brunham et coll., 1994). Il a été démontré que même en présence de multiples doses bactéricides in vitro, *C. trachomatis* peut rester sous forme persistante, peu ou pas sensible aux antibiotiques à leurs doses habituelles, et provoquer ultérieurement des récurrences avec de graves conséquences immunopathologiques (Beatty et coll., 1994; Dailloux et coll., 1992). Il est connu que des infections chlamydiennes persistantes peuvent se produire in vitro (Beatty et coll., 1994; Moulder et coll., 1991). Plusieurs cas d'infections récurrentes ou persistantes ont été rapportés malgré un traitement d'antibiotique adapté et bien suivi, laissant supposer la persistance de particules intracellulaires à l'état latent inaccessibles

aux antibiotiques; dans plusieurs de ces cas les individus étaient encore infectés avec la même souche de *C. trachomatis*, suggérant que l'infection initiale n'avait pas été guérie (Jones., 1991). Il apparaît donc nécessaire de trouver des doses d'antibiotique qui soient efficaces aussi bien pour les formes aiguës que pour les formes persistantes de *C. trachomatis* et qui puissent être données pour une durée plus courte.

Plusieurs solutions ont été proposées pour contrecarrer l'infection persistante à Chlamydia. Sur le plan pharmacologique, on peut développer un nouveau médicament ou bien modifier la dose, la fréquence, la voie d'administration de médicaments existants (Ravaoarino et coll., 1993). Dans le présent travail, nous proposons d'incorporer les antibiotiques dans des liposomes afin d'augmenter leur activité. Les liposomes sont de bons vecteurs colloïdaux d'antibiotiques. Ils ont déjà été utilisés sur des agents intracellulaires parasites, fongiques, bactériens et viraux (Lopez-Berestein, 1987; Phillips et coll., 1991). Les liposomes ont permis de réduire la toxicité et les doses des drogues, de les protéger contre l'inactivation enzymatique, chimique et immunologique, de faciliter leur transport vers les sites sélectifs d'action, d'accroître leur pénétration intracellulaire et d'y prolonger leur activité antimicrobienne (Coune, 1988).

La présente étude se divise en 3 parties.

Premièrement, nous allons caractériser les sérotypes A, D et L2 de *Chlamydia trachomatis*. Cette caractérisation se fera par l'analyse de leurs profils protéiques, par l'analyse de leurs profils plasmidiques et par l'analyse de leur sensibilité aux antibiotiques sous forme libre et liposomale.

Deuxièmement, nous allons établir une infection persistante in vitro selon le modèle utilisé par Beatty et coll. (Beatty et coll., 1993), modifié dans notre laboratoire.

Troisièmement, nous allons déterminer la sensibilité des souches persistantes aux antibiotiques sous forme libre et liposomale.

1. Revue bibliographique

1.1 Généralités

1.1.1 Historique

En 1906, Halberstaedter et Von Prowazek (Halberstaeder et coll. 1907; Prowazek et coll.1907), travaillant à Java sur des malades atteints de trachome, ont observé dans les frottis de grattages conjonctivaux colorés au Giemsa des cellules présentant à l'intérieur de leur cytoplasme des masses ponctuées appelées inclusions. Ils ont alors pensé qu'il existait une relation entre la présence de ces inclusions et la conjonctivite trachomateuse. Ils ont essayé de transmettre la maladie au babouin, un des rares animaux sensibles. Inoculé par voie conjonctivale en grattant la muqueuse, l'animal a développé une conjonctivite folliculaire dans laquelle ils ont mis en évidence ces mêmes cellules à inclusion. L'étiologie infectieuse de cette maladie était ainsi démontrée. Mais la nature de l'agent pathogène restait encore mystérieuse. Ces premiers auteurs pensent tout d'abord à un parasite proche des protozoaires, à qui ils donnent le nom de *Chlamydozoon*.

Plusieurs années plus tard, en 1930, lors de la grande épidémie de *psittacose* qui sévit en Europe, Bedson et coll. (1936) mettent en évidence des inclusions semblables à celles du trachome, dans les macrophages de souris inoculées par voie intrapéritonéale avec des crachats de sujets atteints de pneumopathie grave. La culture sur milieux bactériologiques acellulaires étant impossible et la coloration étant violette après utilisation du Giemsa, l'agent pathogène est désigné sous le nom de "virus basophiles". Rake et Jones (1942) décrivent ces mêmes inclusions dans certaines cellules obtenues par ponction de ganglions hypertrophiés observés chez un malade atteint de lymphogranulomatose vénérienne.

À partir de 1942, on assiste à une véritable explosion des maladies à “virus basophiles” chez les animaux, la manifestation pathogène la plus importante chez les mammifères étant l’avortement. On signale également la possibilité d’arthrites et de diarrhées. Cependant, il faudra attendre le perfectionnement des techniques pour en connaître la nature exacte. Le microorganisme a été isolé pour la première fois en 1965 sur l’œuf embryonné de poulet, et il a été observé que le “virus” était sensible aux antibiotiques.

1.1.2 Taxonomie et classification

L’étude des séquences de l’ARNr 16S a permis de classer les chlamyديات parmi les eubactéries, plus proches des flavobactéries et du groupe ϵ des bactéries pourpres parmi lesquelles se trouvent aussi bien *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Wolinella* que des *Rickettsias*, autres bactéries à Gram négatif intracellulaires obligatoires (Barbeyrac et coll., 1997). Les Chlamydiae appartiennent à l’ordre des *Chlamydiales*, qui ne comprennent qu’une seule famille, les *Chlamydiaceae* et un seul genre, *Chlamydia* qui comprend 4 espèces (Moulder et coll., 1984). *C. trachomatis* et *C. psittaci* ont d’abord été décrites dans le genre *Chlamydia* par Page, 1968, puis *C. pneumoniae* par Grayston et coll., 1989 et *C. pecorum* par Fukushi et coll., 1992. Les espèces de *C. psittaci* et *C. pecorum* possèdent de nombreux caractères communs et se différencient essentiellement par leur hôte naturel (tableau I).

L’espèce *C. trachomatis* est divisée en biovars, complexes et sérovars. L’espèce *C. psittaci* inclut des souches isolées d’espèces animales variées appartenant aux mammifères, oiseaux et reptiles. Chez *C. trachomatis*, trois biovars sont connus : pneumonie murine, trachome et lymphogranulome venereum (LGV), ces deux derniers étant à spécificité strictement humaine. Les souches d’origine humaine de *C. trachomatis* sont réparties en 18 sérovars.

Tableau I : Caractéristiques des différentes espèces de *Chlamydia*

Caractéristiques	C. trachomatis	C. pneumoniae	C. psittaci	C. pecorum
Biologiques :				
-hôte naturel	Homme	Homme	Oiseaux, mammifères	Bovins moutons
-cible cellulaire	Épithélium conjonctival et urogénital; monocytes et macrophages (LGV)	Épithélium respiratoire	Épithélium respiratoire	Épithélium respiratoire
Mode de transmission	Contact	Aérosol	Aérosol	Aérosol
-Inclusion				
• Morphologie	Vacuolaire, unique	Ovale, dense	Variable, multiple	Variable, dense
• Présence de glycogène	Oui	Non	Non	Non
• Synthèse des folates	Oui	Non	Non	Non
Génétiques :				
-G + C %	42-45	40	39-43	36-39
- % homologues				
Intraespèces	92-100	94-100	20-100	88-100
Interespèces	< 10	< 10	< 10	< 10
-Présence de plasmide	Oui	Non	Quelques souches	?
Antigéniques :				
Nombre de sérovars	18. Trachoma : 14; LGV : 4	1	Nombreux	3
Pouvoir pathogène :	Trachome, MTS, conjonctivite et pneumonie chez l'enfant	Pneumonie et bronchites; Maladies cardio-vasculaires?	Anthropozoonose	Zoonose
			(pneumopathie chez l'homme)	

biovar LGV comprend 4 sérovars : L1, L2, L2a, et L3. Ces sérovars ont été définis d'après la réactivité d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes portés par la protéine majeure de la membrane externe (MOMP). Par l'analyse des antigènes communs de la MOMP, les souches de *C. trachomatis* sont regroupées en 3 complexes : le complexe B (B, Ba, D, E, L1 et L2), le complexe C (A, C, H, I, J, K et L3) et le complexe intermédiaire (F et G). Le tableau II, nous montre les propriétés des biovars trachome et LGV de *C. trachomatis*.

1.1.3 Importance médicale

1.1.3.1 Généralités

La diversité des tableaux cliniques provoqués par les infections à *Chlamydia trachomatis* s'explique par l'existence de sérotypes différents. Les sérotypes A, B, Ba et C sont responsables du trachome; les sérotypes D jusqu'à K provoquent des infections urogénitales et oculaires, les sérotypes L1, L2, L2a et L3 provoquent la lymphogranulomatose vénérienne (Vanwaeyenbergh et coll., 1993).

1.1.3.2 Le trachome

Le trachome est une kératoconjonctivite chronique contagieuse, caractérisée par la formation de follicules. L'évolution de l'infection peut se faire spontanément vers la

Tableau II
Propriétés des biovars LGV et trachome de *C. trachomatis*

Propriétés	LGV (L 2)	Trachome (A et D)
• Sensibilité aux sulfamidés	+	+
• Hôte naturel : humain	+	+
• Site préférentiel pour infection		
Cellules épithéliales	-	+
Nodules lymphoïdes	+	-
• Croissance en culture cellulaire		
- Formation de plaques sur les fibroblastes de souris	+	-
- Durée du cycle cellulaire	48 heures	72 heures
• Entrée dans la cellule hôte augmentée par		
- Centrifugation	-	+
- Traitement avec DEAE-dextran	-	+

guérison mais en zone d'endémie, les réinfestations successives aggravent le pannus et l'évolution se fait vers un stade cicatriciel avec déformation du tarse et incurvation de la paupière et vers la cécité par formation de travées fibreuses (Baybeyrac et coll., 1997).

Cette maladie est liée au sous-développement, à la malnutrition et au manque d'hygiène. Le trachome est très répandu en Asie et en Afrique. L'homme est le seul réservoir du germe et la transmission se fait à partir du réservoir familial par les mains sales, les poussières véhiculées par le vent et les mouches (Baybeyrac et coll., 1997).

1.1.3.3 Les maladies sexuellement transmissibles (MTS)

1.1.3.3.1 Les infections urogénitales

Chez l'homme, l'infection à *Chlamydia trachomatis* donne lieu à des présentations variées, dont certaines sont les complications d'une infection initiale passée inaperçue. L'urétrite est l'infection la plus commune rencontrée chez l'homme. *C. trachomatis* est la principale cause des urétrites non gonococciques (25 à 60 % des cas) et post-gonococciques (65 à 80 % des cas) (Morisset, 1990). Cette urétrite est souvent asymptomatique.

C. trachomatis et *N. gonorrhoeae* peuvent coexister dans plus de 30 % des cas d'urétrites (Vanwaeyenbergh, 1993). De plus, il est très probable qu'une infection à gonocoque puisse réactiver une urétrite à *C. trachomatis* (Batteiger et coll., 1989).

L'urétrite non traitée peut se compliquer par un rétrécissement urétral, une épididymite, une prostatite ou une orchite et engendrer une stérilité secondaire (Schachter, 1978;

McCormack, 1986); les séquelles d'infection à *C. trachomatis* restent mineures et rares chez l'homme comparativement à celles observées chez la femme.

Chez la femme, l'endocol est le site de prédilection du *Chlamydia trachomatis*. L'endocervicite chlamydienne est asymptomatique dans 70 à 90 % de cas et ces infections peuvent persister pendant des mois et même des années (Stamm, 1999). L'infection est souvent une découverte fortuite lors d'un bilan gynécologique systématique ou à l'occasion d'une consultation motivée par l'apparition d'une uréthrite chez le partenaire (Barbeyrac et coll., 1997). *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* coexistent dans 20 à 80 % des cas de cervicites. Les complications génitales subséquentes à la cervicite peuvent être des endométrites, des salpingites, des douleurs pelviennes chroniques, des grossesses extra-utérines et la stérilité (Schachter, 1978; Cates, 1991; Hillis, 1994).

Chez la femme enceinte infectée, il y a un risque de contamination de l'enfant au cours de son passage par la voie génitale. Un tiers des enfants nés de mère infectée développent une conjonctivite. Chez quelques enfants infectés, une pneumonie peut apparaître 4 à 12 semaines après la naissance (Barbeyrac et coll., 1997).

1.1.3.3.2 La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)

La LGV est une maladie à transmission sexuelle causée par les sérotypes L1, L2, L2a et L3 de *C. trachomatis*. La LGV est très répandue dans les régions tropicales, plus rare dans les pays industrialisés où elle atteint essentiellement les homosexuels masculins, les prostituées ou les voyageurs de retour des zones d'endémie. La LGV possède un tropisme réticulo-endothélial et ganglionnaire (Barbeyrac et coll., 1997).

Cette maladie débutant par un chancre indolore, rapidement résolutif, génital ou anal, pouvant évoluer vers une lymphadénite aiguë avec parfois fistulisations, rectite et

l'évolution vers la chronicité. Les sérotypes L1, L2, L2a et L3 se propagent via les vaisseaux lymphatiques vers les tissus profonds et provoquent une réaction inflammatoire et ensuite une fibrose (Vanwaeyenbergh, 1993).

1.1.3.4 Épidémiologie

Chlamydia trachomatis est l'agent bactérien responsable d'une des maladies transmissibles sexuellement la plus répandue dans les pays industrialisés. Pour l'année 1995, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 89 millions le nombre de cas déclarés de chlamydioses génitales au monde contre 62,2 millions de cas de gonococcies et 12,2 millions de cas de syphilis (Gerbase et coll., 1998).

Au Canada, l'incidence des MTS dues à *C. trachomatis* est de 216 cas pour 100 000 habitants et leur prévalence varie entre 5,3 et 25 % selon les groupes de population et les localités (Davies et coll., 1996). Aux États-Unis on recense plus de 4 millions d'infections annuelles chez les adolescents et les jeunes adultes et 50 000 femmes deviennent infertiles suite à une infection par *C. trachomatis* (Washington et coll., 1987). Les conséquences socio-économiques sont énormes : aux États-Unis, les chlamydioses entraînent des dépenses estimées à 4 milliards de dollars en soin de santé par année (Stamm, 1999). Les chlamydioses sont un problème de santé publique : 50 à 70 % des infections chez la femme sont asymptomatiques. Sans traitement ces bactéries restent infectieuses dans la cellule hôte pendant des mois et sont facilement transmises aux partenaires sexuels (Peeling et coll., 1996). Finalement, des études récentes suggèrent que les infections chlamydiennes peuvent être un important facteur de risque facilitant la transmission du virus de l'immunodéficience humaine (Stamm, 1999).

Chez l'homme, *C. trachomatis* est aussi responsable du trachome, maladie endémique qui touche plus de 500 millions d'individus et représente la première cause de cécité avec 7 millions de cas à travers le monde (Dawson et coll., 1981).

1.1.4 Caractéristiques de la bactérie

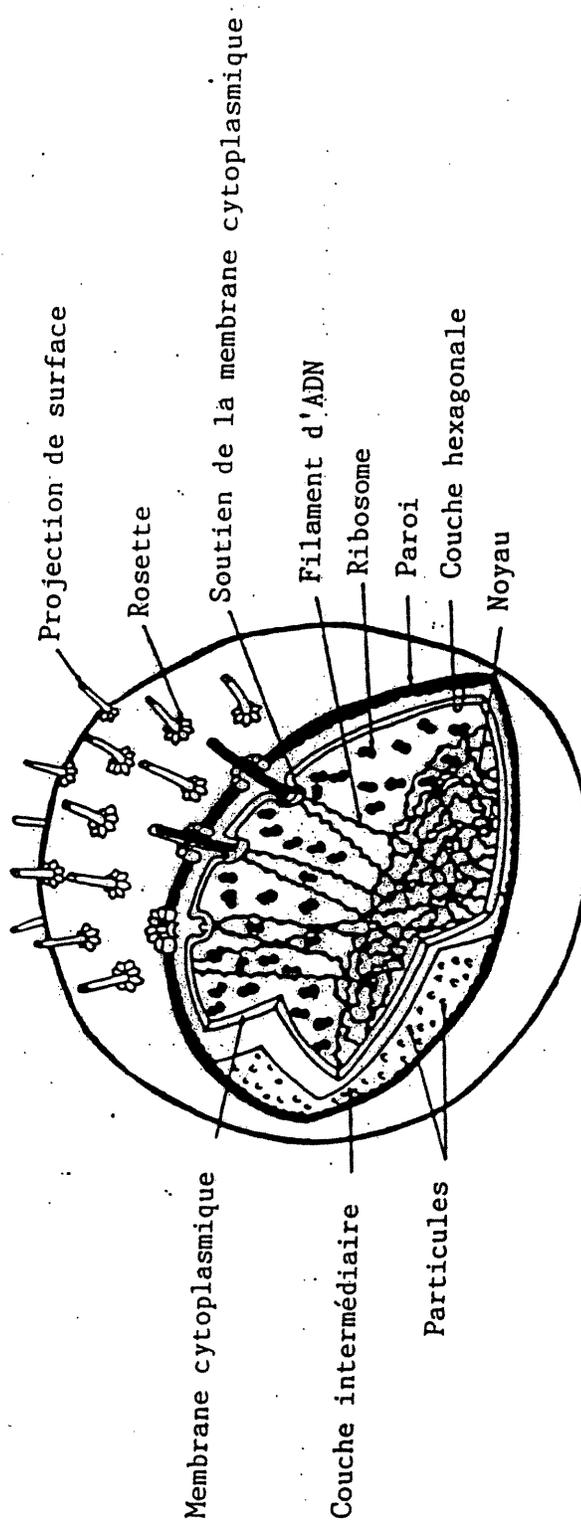
Les Chlamydiae sont des bactéries Gram négatif, non mobiles. Elles se multiplient dans le cytoplasme de la cellule hôte dont elles utilisent l'ATP, formant une inclusion intracellulaire caractéristique. Elles furent longtemps considérées comme des virus, à cause de leur croissance intracellulaire, leur petite taille et leur sensibilité à l'inactivation physique. Cependant elles contiennent de l'ADN, de l'ARN et des ribosomes procaryotiques. Leur membrane externe est de type bactérien. Les Chlamydiae se divisent par fission binaire. Elles sont sensibles aux antibiotiques et aux inhibiteurs métaboliques spécifiques des eucaryotes, tels que le cycloheximide et l'émétine. Elles ont leur propre métabolisme, cependant, elles sont dépendantes de la cellule hôte pour leur production d'énergie (Vanwaeyenbergh, 1993).

Les Chlamydiae ne possèdent ni pili, ni flagelles, elles possèdent par contre des projections de surface, environ 18 à 22 par microorganisme (Matsumoto, 1982). (figure 1)

La taille du génome chlamydien a été estimée à 1045 kpb par électrophorèse en champ pulsé, ce qui représente un des plus petits génomes procaryotiques (Birkelund et coll., 1992). Le pourcentage moléculaire de guanine et de cytosine de l'ADN varie entre 42 et 45 % (Moulder et coll., 1984).

Dans le cycle de développement des Chlamydiae, il y a une alternance entre deux formes distinctes sur le plan morphologique et fonctionnel : les corps élémentaires (CE) et les

Figure 1 : Schéma du corps élémentaire chlamydien
(Matsumoto, 1998)



corps réticulés (CR). Le tableau III montre les différences biologiques entre les CE et les CR.

Tableau III

Différences biologiques entre les corps élémentaires
et les corps réticulés de *Chlamydia trachomatis*

Propriétés	Corps élémentaires	Corps réticulés
Infectivité	Oui	Non
Multiplication	Non	Oui
Capacité d'inhiber la fusion entre le phagosome et le lysosome	Oui	Non
Toxique pour la souris	Oui	Non
Toxique pour les macrophages	Oui	Non
Transport d'ATP	Non	Oui
Synthèse d'ADN, ARN et protéines	Non	Oui
Résistant au stress mécanique et osmotique	Oui	Non

1.1.4.1 Structure et propriétés des corps élémentaires

Le corps élémentaire est la forme extracellulaire de la bactérie. C'est la forme infectieuse des Chlamydiae. Il est responsable de son attachement sur la cellule cible et de promouvoir son entrée dans la cellule. Les CE sont incapables de se multiplier. Ils ont une forme sphérique et une taille d'environ 200 à 400 nm de diamètre. Ils possèdent une paroi rigide et épaisse limitée par une membrane cytoplasmique et par une paroi similaire à celle des bactéries à Gram négatif, composée d'une membrane interne et d'une membrane externe contenant du lipopolysaccharide (LPS), mais qui ne possèdent pas de peptidoglycane. La surface des corps élémentaires est recouverte de projections semblables à des spicules, environ 18 à 22 par CE; ces projections émergent chacune du centre d'une rosette nanométrique de 19 à 20 nm de diamètre (Matsumoto, 1982). (figure 1). Les CE sont résistants au stress mécanique et osmotique.

1.1.4.2 Structure et propriétés des corps réticulés

Le corps réticulé (CR) est la forme intracellulaire des Chlamydiae. C'est la forme métaboliquement active de la bactérie et elle est non infectieuse. Les CR ont une forme sphérique et ont une taille plus grande que celle du CE soit environ 500 à 1300 nm. Ils se divisent par fission binaire. Les CR sont relativement fragiles et ne sont pas capables de survivre à l'extérieur de la cellule hôte.

1.1.4.3 Structure antigénique de *C. trachomatis*

Étant donné la complexité structurale et génétique de *C. trachomatis*, un grand nombre d'antigènes chlamydiens sont sérologiquement reconnus lors d'une infection. La taille du génome de *C. trachomatis* étant d'environ 1 045 kb, il contient assez d'information pour coder environ 600 protéines différentes; à peine 1% des gènes structuraux chlamydiens encodent des antigènes sérologiques (Brunham et coll., 1994).

Ces antigènes peuvent être spécifiques du genre, de l'espèce, de sous-espèce et/ou de type. L'analyse par immunoblot des sérums des femmes avec une infection cervicale à *C. trachomatis* (Brunham et coll., 1994) a permis d'identifier les principaux antigènes chlamydiens (tableau IV).

1.1.5 Protéines de la membrane externe

1.1.5.1 Généralités

La structure de base de la membrane des Chlamydiae est semblable à celle des bactéries à Gram négatif, elle comporte une membrane externe et une membrane interne. La membrane externe est peut-être le composant bactérien le plus étudié chez les Chlamydiae car elle est le point d'interaction entre la bactérie et la cellule hôte. Elle est composée de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides.

Bien que les Chlamydiae partagent des structures similaires avec les autres bactéries Gram négatif, ils ont aussi des caractéristiques spécifiques à eux telles que : l'absence de peptidoglycane sur leur membrane, la prédominance des protéines de l'enveloppe riche en cystéine et la présence des projection à leur surface (Raulston, 1995).

Tableau IV

Caractéristiques des principaux antigènes de *Chlamydia trachomatis*

Antigènes	Poids moléculaire kDa	Fonction	Localisation	Spécificité antigénique
Hsp70 (DnaK)	75	protéine de stress	CE, CR	espèce
Hsp60 (GroEl)	57-60	protéine de stress	CE, CR	espèce
Omp-2	60; 60/62	protéine membranaire	CE	genre, espèce, type
Omp-1 ou MOMP	38-45	protéine majeure de la membrane externe	CE, CR	genre, espèce, sous-espèce, type
Omp-3	12-15	protéine membranaire	CE	genre, espèce, type
Lipopolysaccharide (LPS)	10	KDO transferase	CE, CR	genre

Adapté de Brunham et coll., 1994.

Après traitement des Chlamydiae par un détergent non ionique, tel que le sarkosyl, on obtient une fraction de la membrane externe qui est insoluble dans le sarkosyl. Cette fraction est appelée complexe de la membrane externe chlamydiennne (Caldwell et coll., 1981). Ce complexe est composé d'une protéine communément appelée MOMP, pour protéine majeure de la membrane externe, de deux protéines riches en cystéine ayant des masses moléculaires respectives de 60 kDa et 12-12,5 kDa, et d'une protéine de 96 kDa (Barron, 1988).

1.1.5.2 Protéine majeure de la membrane externe (MOMP)

Depuis la mise en évidence de la protéine majeure de la membrane externe, un grand intérêt lui est porté. La MOMP aussi appelée Omp1 représente 60% du poids sec de la membrane externe. Différents travaux ont en effet mis en évidence le rôle de cette protéine au niveau de la structure de la bactérie, du cycle de développement, de la physiologie, de l'attachement Chlamydia-cellule hôte et finalement comme porine. De plus, cet antigène présente, du fait de sa variabilité, un grand intérêt pour des études de typage aussi bien au niveau immunologique que génétique. Enfin, du fait de la présence d'épitopes neutralisants sur cette protéine majeure, elle constitue l'un des principaux candidats pour la mise au point d'un vaccin (C De Sa, 1996).

1.1.5.3 Caractéristiques biochimiques

La MOMP est exprimée tout au long du cycle de développement et sa masse moléculaire varie entre 38 et 45 kDa selon les souches (Caldwell et coll., 1981; Hatch et coll., 1981;

Newhall et coll., 1982). Elle est caractérisée par son insolubilité dans le sarkosyl, détergent qui possède la propriété de solubiliser le cytoplasme et la membrane cytoplasmique des bactéries Gram négatif tout en conservant intacte la membrane externe. Le traitement des Chlamydiae dans ce détergent préserve la morphologie caractéristique ronde et rigide des CE. La protéine est bien solubilisée sous sa forme d'environ 40 kDa après traitement avec le SDS, associé à un agent réducteur des ponts disulfures, le β -mercaptoéthanol (Newhall et coll., 1981).

1.1.5.4 Rôle dans la structure de la bactérie

Les résultats des travaux de Hatch et coll., (1981) ont montré la nécessité de la présence d'un agent réducteur pour solubiliser la MOMP. De plus, les travaux de Newhall et Jones (1983) mettant en évidence des polymères de la MOMP liés de façon covalente par des ponts disulfures révèlent l'existence d'un réseau membranaire de MOMP consolidé par des liaisons entre cystéines. Ce réseau pourrait être responsable de la structure et de la rigidité des CE. (Tamura et Manire, 1967). Des complexes dimériques, trimériques et multimériques de la MOMP ont été identifiés dans les corps élémentaires chlamydiens (Newhall et Jones, 1983). Ce réseau de liaisons covalentes remplacerait le peptidoglycane qui n'a jamais été mis en évidence chez les Chlamydiae (Fox et coll., 1990).

D'autres protéines riches en cystéine sont également impliquées dans ce réseau tel que la protéine Omp2 (58 à 62 kDa) et la protéine Omp3 (12 à 15 kDa) (Caldwell et coll., 1981, Hatch et coll., 1984; Hatch et coll., 1996). Leurs tailles varient entre les biovars LGV et trachoma. Les analyses de leur séquence ont montré que les protéines Omp2 et Omp3 contiennent respectivement 24 et 13 résidus de cystéine contre 7 à 9 pour la protéine Omp1 (Allen et coll., 1990).

Les CR sont déficients en Omp2 et Omp3, et bien qu'il y ait à peu près la même quantité de MOMP aussi bien dans les CR que dans les CE, la MOMP est principalement sous forme monomérique, ce qui expliquerait la plus grande fragilité des CR à des agents tels que les ultrasons (Tamura et Manire, 1967).

1.1.5.5 Rôle de la MOMP dans le cycle de développement

La MOMP interviendrait aussi dans la différenciation des CE en CR. La MOMP, et d'une façon plus générale, les ponts disulfures de la membrane externe, jouent un rôle important dans le cycle de développement des Chlamydiae. Les CE, infectieux et métaboliquement inactifs, possèdent un réseau de ponts disulfures qui les rend rigides et résistants aux agressions extérieures. Après internalisation, la réduction des ponts disulfures est corrélée avec la différenciation en CR et entraînerait une augmentation de la perméabilité membranaire, notamment grâce à la formation de pores. Cela permettrait aux CR de récupérer des métabolites pour croître et se diviser (C De Sa, 1996).

1.1.5.6 Variabilité antigénique et génétique de la MOMP

La MOMP tient une place prépondérante au niveau de la structure mais elle est également très importante du point de vue antigénique. La protéine est immunogène chez l'homme et l'animal et possède des épitopes spécifiques de genre, d'espèce, de sous-espèce et de sérotype (Batteiger et coll., 1986; Stephens et coll., 1988; Mondesire et coll., 1989; Baghian et coll., 1990). De ce fait la MOMP est le principal candidat pour la mise au point d'un vaccin. Cette variabilité antigénique permet à la MOMP d'être un antigène important pour l'immunotypage des Chlamydiae (Batteiger et coll., 1986; Fukushi et Hirai, 1988).

La variabilité antigénique de la MOMP est corrélée avec un polymorphisme génétique. Ce dernier résulte de mutations ponctuelles au niveau des domaines variables (Hayes et coll., 1995) qui, sous la pression de sélection, aboutissent à l'émergence de nouveaux types de MOMP. D'autre part, des mécanismes de recombinaison entre souches, intervenant aussi bien au niveau des domaines variables (Hayes et coll., 1994) que des domaines constants (Sayada et coll., 1995b), sont également responsables de cette variabilité génétique.

1.1.5.7 La protéine de stress (heat shock protéine : Hsp60)

La hsp60 appartient à la grande famille des protéines de choc thermique de 60 kDa (Hsp60 ou GroEL) largement distribuées dans pratiquement tous les organismes. Par définition, l'expression de cette protéine est augmentée comme résultat de l'exposition de l'organisme à des conditions de stress, comme la chaleur ou le contact avec des agents chimiques tels que l'éthanol ou le peroxyde d'hydrogène (Christman et coll., 1985; Morgan et coll., 1986; van Bogelen et coll., 1987). Cette protéine est présente dans les CE et les CR; elle se retrouve aussi dans les inclusions au cours du cycle de développement de *C. trachomatis*.

La hsp60 est une protéine chaperonne, ayant un rôle clé dans le repliement, l'assemblage et la translocation des protéines (van Eden et coll., 1998). Au niveau cellulaire, les hsp60 peuvent bloquer l'apoptose et éviter que les protéines hôtes subissent des dommages reliés au stress en facilitant leur renaturation ATP-dépendante et leur repliement (Hightower et coll., 1991).

La hsp60 est une protéine phylogénétiquement conservée. Cette protéine présente 60 % d'homologie avec son homologue chez *Escherichia coli* (GroEs) et 48 % d'homologie avec la hsp60 humaine (Brunham et coll., 1994). Malgré cette homologie, la hsp60 est hautement immunogénique. La protéine hsp60 est un antigène associé à l'hypersensibilité

retardée (Morrison et coll., 1989). Elle constitue un marqueur d'infection chronique ou répétée, induisant la production d'anticorps dont la prévalence et les titres sont significativement élevés lors de complications d'infections oculaires (Peeling et coll., 1996) et génitales (Brunham et Peeling, 1994; Brunham et coll., 1992) à *C. trachomatis*.

1.1.5.8 Implication de la hsp60 dans la pathogénèse des infections à *C. trachomatis*

Les infections oculaires et urogénitales à *C. trachomatis* peuvent progresser, pour aboutir à une maladie inflammatoire chronique pouvant amener des séquelles sévères telles que la cécité, l'infertilité et l'arthrite. Il semble que la pathophysiologie de ces maladies chroniques soit médiée par le système immunitaire, et que la protéine chlamydienne hsp60 soit impliquée comme principal antigène stimulant la réponse immunopathologique (Brunham et coll., 1994).

L'association entre la réponse immunitaire induisant la production d'anticorps dirigés contre la hsp60 et la maladie inflammatoire pelvienne (PID), les grossesses extra-utérines, l'infertilité tubaire et le trachome a été documentée par plusieurs groupes (Wagar et coll., 1990; Brunham et coll., 1992; Toye et coll., 1993; Arno et coll., 1995; Peeling et coll., 1996).

La prévalence des anticorps anti-hsp60 chez les femmes montrant différentes manifestations suite à des infections chlamydiennes a également été étudiée (Brunham et coll., 1994). De ces études, on peut observer que 36 à 44% des femmes ayant une cervicite à *C. trachomatis*, 48 à 60% des femmes avec une maladie inflammatoire pelvienne (PID) et 81 à 90% des femmes ayant une stérilité tubaire associée à *C. trachomatis* présentent une réponse en anticorps à l'égard de la hsp60 chlamydienne. Parmi les femmes souffrant d'une maladie inflammatoire pelvienne, celles ayant les titres les plus élevés en anticorps

anti-hsp60, sont celles qui ont les manifestations inflammatoires les plus sévères. Ceci suggère que la hsp60 induit une réponse immunitaire immunopathologique (Brunham et coll., 1994).

La réponse immunitaire à l'égard des protéines microbiennes hsp, en particulier la hsp60, pourrait, par l'intermédiaire d'un mimétisme antigénique, déclencher une réponse auto-immune contre les protéines de stress humaines et provoquer par la suite un dommage tissulaire (Brunham et coll., 1994). Une réponse en anticorps à l'égard de la hsp60 humaine a d'ailleurs été observée chez des patients avec une arthrite juvénile chronique et aussi chez des patients ayant diabète (van Eden et coll., 1998).

1.1.5.9 Autres protéines

L'analyse par SDS-PAGE de la composition polypeptidique des corps élémentaires purifiés montre que *C. trachomatis* possède un grand nombre de protéines mais qu'un petit nombre de celles-ci comptent pour la majorité de la masse protéique totale (Barron, 1988). Les protéines sont identifiées par leur masse moléculaire. Les protéines les plus abondantes sont la protéine majeure de la membrane externe avec une masse moléculaire de 38 à 45 kDa, la protéine de la membrane externe de 60 kDa, une protéine ayant une masse d'environ 29 kDa et la protéine de 12-12,5 kDa. Parmi ces protéines, la MOMP, la protéine de 60 kDa et la protéine de 12 kDa sont des protéines riches en cystéine. Ces protéines sont respectivement codées par les gènes *omp1*, *omp2* (*envB*) et *omp3* (Raulston, 1995). Elles forment un réseau membranaire consolidé par des liaisons entre cystéines. Ce réseau de liaisons covalentes remplacerait le peptidoglycane qui n'a jamais été mis en évidence chez les Chlamydiae (Fox et coll., 1990)

D'autres protéines désignées par leur masse moléculaire seraient aussi présentes chez les Chlamydiae. Parmi celles-ci figurent les protéines de 155 Kda, 96 kDa, 45kDa, 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*. Toutes ces protéines seraient associées aux enveloppes chlamydiennes. Plus récemment, 12 autres protéines qui seraient des composantes potentielles des enveloppes chlamydiennes ont été rapportées (Raulston, 1995).

1.1.6 Le lipopolysaccharide chlamydien (LPS)

Le LPS chlamydien est un constituant antigénique majeur et ressemble au LPS type de *Salmonella typhimurium*. Il est constitué de D-glucosamine, d'acide 2 ceto-3 désoxyoctulosonique, d'acides gras 3-hydroxylés à longues chaînes et de phosphates (Raulston, 1995). Le LPS chlamydien a un poids moléculaire apparent de 10-12 kDa , défini par sa mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide, mais sa masse moléculaire calculée est de 3 kDa (Nurminen et coll., 1985). Le LPS chlamydien s'accumule dans la membrane plasmique des cellules hôtes infectées, ce qui constitue une observation intégrante (Raulston, 1995). Karimi et coll. (1989) ont proposé que l'incorporation des LPS chlamydiens dans la membrane plasmique eucaryotique réduirait sa fluidité et ainsi, rendrait les cellules hôtes infectées moins sensibles à l'attaque des lymphocytes cytotoxiques. En plus des protéines et des LPS, la membrane externe des Chlamydiae est composée de phospholipides. L'analyse des lipides extraits des CE et des CR purifiés de *C. trachomatis* par chromatographie en couche mince à 2 dimensions, a permis d'établir la composition en phospholipides de la membrane externe des CE et CR.

Le phosphatidyl éthanolamine constitue le lipide majeur de la membrane externe des Chlamydiae et avec la phosphatidylcholine, ils constituent plus de 60% des lipides totaux de la membrane externe. On trouve aussi du diphosphatidylglycérol, du phosphatidylglycérol, du phosphatidylinositol, de la sphingomyéline, de la phosphatidylsérine et de la lysophosphatidylcholine. (Newhall, 1988).

1.1.7 ADN plasmidique

Les plasmides sont des éléments extrachromosomiques présents chez certaines bactéries et levures. Ces éléments sont des petites molécules circulaires d'ADN bicaténaire qui se multiplient de façon indépendante à l'intérieur de ces microorganismes.

La présence d'un plasmide cryptique d'environ 7,3 kpb a été démontrée dans presque toutes les souches de *C. trachomatis*. Il est présent à raison de 10 copies par chromosome chlamydien (Birkelund, 1992).

Ce plasmide est hautement conservé entre les souches avec moins de 1 % de variation dans sa séquence (Comanducci et coll., 1990). Il a été démontré que le plasmide de *C. trachomatis* existe aussi sous forme dimérique et multimérique.

L'identification de souches cliniques de *C. trachomatis* dépourvues de plasmide montre qu'il n'est pas essentiel au développement et au caractère infectieux de la bactérie (Peterson et coll., 1990). La fonction du plasmide chlamydien reste encore inconnue.

1.1.8 Culture cellulaire

Chlamydia trachomatis, un parasite intracellulaire obligatoire, ne peut se multiplier que dans des cellules vivantes. Les cellules en culture sont de ce fait le matériel de choix pour la

multiplication des Chlamydiae, car elles sont dépourvues de système immunitaire capable d'entraver la croissance chlamydienne.

L'œuf embryonné de poule a été le premier modèle cellulaire à être utilisé pour la culture et l'isolement des Chlamydiae. Ce modèle cellulaire est particulièrement sensible à toutes les souches de *C. trachomatis*. Cependant les contaminations bactériennes représentaient un inconvénient important de cette technique. C'est principalement pour cette raison que la méthode de choix est actuellement l'inoculation en culture cellulaire.

Différentes lignées cellulaires (MacCoy, HeLa229) permettent la multiplication de *C. trachomatis* mais leur sensibilité reste peu élevée. Il faut utiliser différentes modalités expérimentales pour augmenter leur sensibilité.

Le facteur le plus important est la centrifugation. Le taux d'isolement maximal s'obtient après centrifugation, à 3 000 g, pendant 1 heure à 35°C (Weiss et coll., 1960).

Un autre facteur augmentant la sensibilité des cellules est la modification de la charge à la surface des cellules par traitement au préalable des cellules à infecter par des polycations comme le diéthylaminoethyl (DEAE)-dextran (Kuo et coll., 1972). Le prétraitement des cellules au DEAE-dextran et la centrifugation 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 coll., 1972; Moulder, 1991).

Les polycations permettraient d'éviter les répulsions électrostatiques dues aux charges négatives de surface alors que la centrifugation aurait pour effet d'accroître le contact CE-cellule hôte (Moulder, 1991).

L'observation d'un plus grand développement des inclusions dans une culture en phase stationnaire a conduit à inhiber la multiplication cellulaire pour augmenter le rendement.

Le cycloheximide est un inhibiteur de la synthèse protéique des cellules animales, son utilisation augmente les possibilités de détection de *C. trachomatis* et donc la sensibilité de la culture cellulaire à ces derniers.

La température optimale pour l'incubation des cultures chlamydiennes varie selon les souches à cultiver. Les souches du biovar trachome ont une température optimale de croissance à 35°C, tandis que les souches du biovar LGV poussent mieux à 37°C (Schachter et coll., 1994).

1.1.9 Milieux de culture

Les cellules animales en culture nécessitent l'apport d'un certain nombre d'éléments : ce sont les besoins nutritifs. Aux milieux dits "naturels", exclusivement utilisés autrefois (plasma de poule, sérum, extrait embryonnaire) se sont progressivement substitués des milieux synthétiques dont la composition exacte est connue. Ils comprennent des sels minéraux (de sodium, potassium, calcium et magnésium...), des glucides, du glucose, des acides aminés, au nombre de 13, et des facteurs de croissance. Mais quelle que soit la composition de ces milieux il est nécessaire, pour obtenir une croissance cellulaire continue, d'y ajouter une certaine quantité de sérum d'animal jeune (veau le plus souvent) ou même de fœtus. Le rôle du sérum est double : d'une part il favorise la fixation des cellules sur leur support et d'autre part, il apporte des facteurs de croissance et des oligo-éléments nécessaires à la multiplication cellulaire. Le milieu de culture des Chlamydiae le plus souvent utilisé est le milieu minimal essentiel Eagle supplémenté d'acides aminés, de vitamines, de 5 à 10% de sérum fœtal de veau, de L-glutamine (2mM) et de glucose.

L'addition de bicarbonate de sodium ou de 10mM d'acide 2-n-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique (tampon HEPES) permet de maintenir le milieu à un pH neutre.

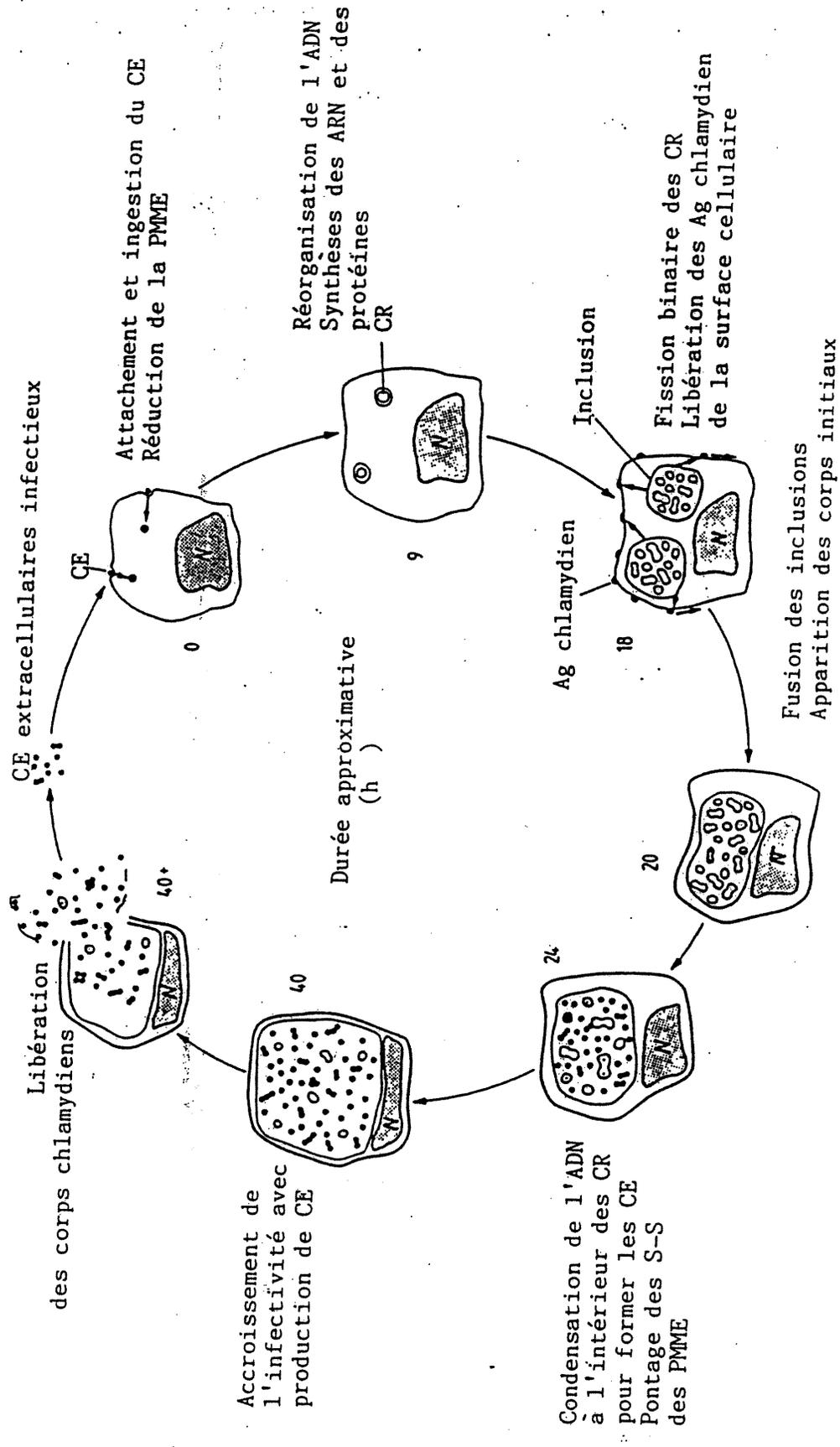
1.1.10 Cycle de développement

Le cycle de développement des Chlamydiae est identique quelle que soit l'espèce malgré les quelques différences dans la morphologie des inclusions (figure 2).

Le CE initie l'infection en s'attachant à 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). Ceux du biovar LGV infectent préférentiellement les monocytes surtout, les macrophages en particulier et se propagent vers les vaisseaux lymphatiques. Après attachement, le CE pénètre dans la cellule par phagocytose. Lors de l'ingestion du CE, seule la cellule hôte dépense de l'énergie. Cette phagocytose provoque la formation d'une vacuole ou inclusion chlamydienne dont la fusion avec les lysosomes est inhibée. La membrane de cette inclusion dérive de celle de la cellule modifiée par la bactérie. Dès son entrée dans la cellule, le CE commence à se réorganiser. Quelques heures après l'infection, il y a différenciation des CE en CR. Les CR sont la forme métaboliquement active de la bactérie et la seule capable de se diviser, par contre cette forme n'est pas infectieuse. 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 fission binaire.

La différenciation des CE en CR se caractérise par une modification de la structure de la protéine de la membrane externe par réduction des ponts disulfures, une augmentation de la

Figure 2 : Cycle du développement des Chlamydia (Ward, 1988)



perméabilité membranaire, une décondensation du chromosome, la synthèse d'ADN et de protéines et une augmentation de la taille. Le rapport ARN/ADN passe de 1 : 1 à 3 : 1. Une fois démarrée, la réorganisation des CE en CR est très rapide et après 8 à 12 heures post-infection, la population est presque entièrement formée de CR (Moulder, 1991).

Une fois matures, les CR se multiplient par fission binaire à l'intérieur d'une vacuole appelée inclusion chlamydienne. L'infectivité intracellulaire apparaît après 20 heures post-infection et est corrélée avec l'apparition des CE. La réorganisation des CR en CE s'accompagne d'une réduction de la taille, d'une condensation du nucléoïde et de la formation d'une membrane externe rigide par polymérisation de la MOMP. La durée du cycle de développement des souches du biovar LGV est d'environ 48 heures tandis que celle du biovar trachoma est d'environ 72 heures. In vitro, une cellule infectée peut contenir entre 100 et 1000 CE infectieux, par contre, leur nombre n'est pas connu pour les cellules infectées in vivo (Moulder, 1991; Ward, 1988).

À la fin du cycle, les CE sont relargués par lyse de la cellule hôte, mais des inclusions intactes peuvent être relarguées de la cellule (Moulder, 1991., Barbeyrac et coll., 1997).

1.1.10.1 Effet de la multiplication sur la cellule hôte

À faible dose infectante, la cellule peut continuer à se diviser. La cellule qui se divise peut produire soit deux cellules filles infectées soit une seule sur deux. Il est possible que la production de cellules non infectées limite la dissémination au site infecté. L'activité spécifique des cellules hôtes et notamment l'activité ciliaire est inhibée. Comme la plupart des parasites intracellulaires, les Chlamydiae modifient la membrane de la cellule hôte au bénéfice du parasite. On trouve du LPS non seulement dans l'inclusion mais aussi dans la

membrane cytoplasmique de la cellule infectée et les structures membranaires des cellules adjacentes non infectés (Barbeyrac et coll., 1997).

1.1.11 Altération du cycle de développement : notion de persistance

1.1.11.1 Généralités

Dans certaines conditions, le cycle de développement des Chlamydiae peut être altéré, c'est-à-dire qu'il y a un retard de maturation des corps réticulés, une inhibition de la différenciation en corps élémentaires infectieux. Ceci se traduit par une altération morphologique des CR provoquant la formation de formes élargies atypiques et une persistance de ces formes aberrantes dans la cellule (Barbeyrac et coll., 1997).

Le terme de persistance correspond à une association à long terme entre bactérie et hôte dans laquelle la bactérie est viable mais non cultivable. Cet arrêt de croissance est corrélé à une réduction de l'activité métabolique qui empêche la division et retarde la différenciation de corps réticulé en corps élémentaire, par conséquent établissant un état de culture négative. L'existence de formes persistantes de Chlamydia intracellulaires dans une forme morphologiquement altérée a été suggérée pour la première fois par Moulder et coll. (1980). Après élimination du cycloheximide du milieu de culture, Moulder et coll. ont pu maintenir pendant 100 jours dans des cultures de cellules McCoy infectées, les Chlamydiae sous des formes altérées, viables mais cryptiques car non reconnaissables au microscope optique. La cure complète des infections persistantes par l'addition de 10µg/ml de minocycline au milieu de culture, pendant 5 jours, indique que la transcription de l'ADN chlamydien et la traduction des ARNm se poursuivaient dans ces formes microbiennes atypiques.

Le concept de persistance n'est pas nouveau (Meyer et coll., 1933) et était reconnu comme un facteur principal de pathogénicité.

Cette altération du cycle de développement induisant l'état de persistance a été identifiée en présence de certains antibiotiques, pendant une déficience des nutriments ou en présence de facteurs d'ordre immunitaire (Beatty et coll., 1994; Moulder, 1991).

1.1.11.2 Persistance induite par une déficience en nutriments

Plusieurs études ont établi des infections persistantes en maintenant les cellules hôtes infectées dans un milieu de culture déficient en nutriments (Morgan, 1956; Bader et coll., 1961). L'aboutissement du cycle de développement des Chlamydiae en culture in vitro, dépend de l'issue de la compétition entre les microorganismes et la cellule hôte pour l'assimilation des métabolites. En routine, en culture cellulaire in vitro, on oriente un cycle de développement productif en utilisant un inhibiteur de synthèse protéique des cellules eucaryotes hôtes, permettant ainsi de rendre disponible les nutriments et métabolites divers pour les Chlamydiae. 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. Les Chlamydiae restent alors en vie mais sont dans un état non infectieux. L'addition d'un milieu de culture complet stimule la croissance et le rétablissement de l'infectivité des Chlamydiae (Bader et coll., 1961).

L'épuisement de cystéine dans le milieu de culture interrompt la différenciation des CR en CE dans 10 différents sérovars de *C. trachomatis* et 3 sérovars de *C. psittaci* (Allan et coll., 1985). L'effet est réversible, la différenciation des CR en CE reprend en additionnant de la cystéine dans le milieu de culture. Cet acide aminé est essentiel pour la biosynthèse de 3 protéines riches en cystéine nécessaires pour la différenciation des CR en CE (Beatty et coll., 1994). La glutamine, la leucine et la phénylalanine sont des acides aminés essentiels

pour la majorité des souches des Chlamydiae alors que la valine est essentielle pour toutes les souches (Allan et coll., 1983). La réduction de l'un de ces acides aminés essentiels dans le milieu de croissance peut donc avoir comme effet d'arrêter le cycle de développement des Chlamydiae.

1.1.11.3 Agents antimicrobiens et persistance.

L'altération du cycle de croissance des Chlamydiae peut aussi être induite en présence de certains antibiotiques.

Le traitement des Chlamydiae avec la pénicilline n'a aucun effet sur la différenciation initiale des CE en CR mais prévient la différenciation des CR en CE par blocage de la synthèse de la protéine omp2, à l'origine du développement de formes élargies morphologiquement anormales (Barbeyrac et coll., 1997). Le traitement des cultures infectées par des souches de sérovar LGV de *C. trachomatis* avec la pénicilline n'a aucun effet sur la synthèse de la MOMP, par contre la synthèse de la protéine de l'enveloppe de 60-kDa, une composante de l'intégrité structurale, est complètement inhibée (Cevenini et coll., 1988). L'enlèvement de la pénicilline du milieu de culture résulte en une subdivision des formes aberrantes produisant des CR typiques avec maturation et production des CE infectieux (Galasso et coll., 1961; Matsumoto et coll., 1970). Étant donné la déficience en peptidoglycane des Chlamydiae (Garrett et coll., 1974; Barbour et coll., 1982), le mécanisme d'inhibition de la croissance par la pénicilline reste encore inconnu.

Le traitement des cultures infectées par *C. trachomatis* avec l'ampicilline altère aussi le cycle de croissance des chlamydies. L'ampicilline bloque la conversion des CR en CE. L'effet de l'ampicilline sur la synthèse des protéines chlamydiennes révèle que l'arrêt du développement est accompagné d'une inhibition marquée de l'expression des protéines de

la membrane de 60-kDa et 12-kDa, tandis que la production de la MOMP est peu affectée (Sardinia et coll., 1988). Clark et coll. (1982) ont observé que lorsque l'érythromycine est ajoutée 12 h après infection des cellules, il y a un blocage de la différenciation des CE en CR. Si l'addition de l'érythromycine est faite entre 18 et 24 h après infection, il y a plutôt blocage de la différenciation des CR en CE avec formation de CR atypiques de plus grande taille. Par contre l'antibiotique n'a aucun effet sur le cycle de développement si l'addition de l'antibiotique est faite au-delà de 24 h après l'infection.

D'autres antibiotiques tels que le chloramphénicol, la chlortétracycline, les sulfamides et l'aminoptérine interrompent le développement intracellulaire des Chlamydiae (Kramer et coll., 1971; Tribby et coll., 1973; Hammerschlag et coll., 1982; Pollard et coll., 1963; Reeve et coll., 1968). Un grand nombre d'antibiotiques sont capables d'inhiber la différenciation chlamydienne. Les effets des différents antibiotiques varient selon l'étape du développement du cycle au cours duquel les cellules infectées sont exposées à ces substances (Beatty et coll., 1994).

Quant on compare l'altération du cycle de développement provoquée par ces antibiotiques, on peut voir que la molécule cible pour chacun est largement différente, ce qui suggère qu'il existe plusieurs mécanismes par lesquels la différenciation peut être inhibée et la persistance produite (Beatty et coll., 1994).

1.1.11.4 Persistance induite par des facteurs d'ordre immunitaire

1.1.11.4.1 Interféron gamma et persistance

La plupart des travaux portant sur la persistance induite par des facteurs immunitaires ont été faits avec des cytokines régulant le système immunitaire; ces cytokines n'affectent pas

directement les Chlamydiae mais causent plutôt des altérations dans la cellule hôte interférant avec le cycle de croissance normal des Chlamydiae. La cytokine la plus largement étudiée est l'IFN- γ .

Les Chlamydiae ont été parmi les premiers pathogènes non viraux, reconnus capables d'induire l'IFN- γ et il a été montré que la croissance chlamydienne était inhibée en sa présence (Merigan et coll., 1966). Chez l'homme, l'IFN- γ est produit lors d'infections chlamydiennes naturelles. Après stimulation par les antigènes chlamydiens, des lymphocytes T sécrètent l'IFN- γ . Initialement appelé facteur activateur des macrophages, l'IFN- γ active les phagocytes pour détruire le microorganisme. L'IFN- γ inhibe la multiplication d'un grand nombre de parasites intracellulaires (Pfefferkorn, 1984), les Chlamydiae inclus (Merigan et coll., 1966). In vitro, l'IFN- γ inhibe la croissance de *C. trachomatis* et *C. psittaci* par induction d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme catalysant la dégradation du tryptophane (Byrne et coll., 1986). Ce mécanisme était déjà connu responsable d'activer les cellules hôtes et de limiter la croissance des protozoaires intracellulaires obligatoires tels que *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn, 1984).

L'épuisement du tryptophane exogène est en corrélation avec l'inhibition de la croissance de *C. psittaci* et de *C. trachomatis* (Barbeyrac et coll., 1997). L'analyse des besoins en acides aminés pour la croissance de *C. trachomatis* a montré que toutes les souches étudiées ont besoin de leucine, de phénylalanine, de valine, d'histidine et de glutamine pour une croissance normale. Les souches de type trachome (A, B, Ba et C) requièrent tous ces acides aminés en plus du tryptophane (Allan et coll., 1983). Ce besoin en tryptophane seulement pour les souches de type trachome est en accord avec plusieurs études qui montrent que l'IFN- γ induit la persistance de *C. trachomatis* serotype A (Beatty et coll., 1993).

Tandis que des concentrations élevées d'IFN- γ inhibent la croissance chlamydienne, des concentrations faibles d'IFN- γ induisent la formation des formes intracellulaires morphologiquement aberrantes (Beatty et coll., 1993).

Le traitement des cellules infectées par *C. trachomatis* sérotype A résulte dans la formation des formes élargies atypiques, non infectieuses, distinctes des corps élémentaires et des corps réticulés et morphologiquement similaires à celles induites par traitement à la pénicilline (Beatty et coll., 1993).

L'infection persistante à *C. trachomatis* se manifeste non seulement par des modifications morphologiques mais aussi par des modifications d'expression d'antigènes chlamydiens avec une synthèse continue d'hsp60, un antigène immunopathogène et une réduction de la synthèse de la MOMP, un antigène protecteur (Barbeyrac et coll., 1997).

De plus, ces formes persistantes montrent une diminution des niveaux d'autres constituants structuraux chlamydiens tels que la protéine de l'enveloppe de 60-kDa et des lipopolysaccharides (Beatty et coll., 1993). Le tableau V, résume le mécanisme de la persistance induite par l'IFN- γ et les caractéristiques de l'infection persistante.

Si la sécrétion d'hsp60 est une réponse à l'IFN- γ , cela implique que le développement de la persistance est médié par le système immunitaire et qu'il est une réponse liée au stress (Beatty et coll., 1994). L'IFN- γ est le médiateur d'une infection persistante qui peut être maintenue pendant plusieurs semaines en culture cellulaire de manière réversible, avec réactivation des organismes infectieux viables après retrait de l'IFN- γ , le mécanisme de cette réversibilité est inconnu (Beatty et coll., 1993). On ne sait pas s'il s'agit de l'activation de quelques CR normaux qui persistent au sein des CR anormaux ou s'il s'agit d'une réorganisation des CR anormaux. Il semble que des CE infectieux proviennent d'un réarrangement des formes anormales, ce qui tendrait à démontrer que l'état de

persistance est une véritable alternative de développement et non un état de mort (Beatty et coll., 1994).

Tableau V

Développement de la persistance chlamydienne par l'IFN- γ

Événement médié par l'IFN- γ	Caractéristiques de l'infection persistante
Induction de l'indoléamine 2,3-dioxygénase par l'IFN- γ	Inclusions chlamydiennes aberrantes morphologiquement élargies
Dégradation du tryptophane intracellulaire	Organisme viable mais non cultivable
Taux insuffisants de tryptophane pour une croissance normale	Synthèse continue hsp60
Développement de l'infection persistante	Réduction de la synthèse de la MOMP, de la protéine membranaire de 60-kDa et de LPS

1.1.11.4.2 Le facteur nécrosant des tumeurs alfa (FNT- α) et persistance

Le FNT- α est un autre médiateur pouvant induire le phénomène de persistance chez *Chlamydia*. Le FNT- α est un facteur immunitaire produit par les macrophages lors d'une réponse inflammatoire. En culture cellulaire, l'effet du FNT- α sur les *Chlamydiae* ressemble à celui de l'IFN- γ . Le FNT- α semble interférer avec la conversion des CR en CE. Non seulement l'action du FNT- α ressemble à celle de l'IFN- γ mais ces deux cytokines fonctionnent de manière synergique pour inhiber la multiplication chlamydienne (Moulder, 1991).

Il a été suggéré que le FNT- α induit la synthèse d'indoleamine-2,3-dioxygénase. L'effet inhibiteur de FNT- α sur la croissance de *C. trachomatis* est effectivement supprimé par des taux élevés de tryptophane (Moulder, 1991).

1.1.11.5 Évidence de l'existence des souches persistantes in vitro

Beatty et coll. ont développé un modèle pour l'étude de la persistance in vitro. Ils ont étudié la persistance chez la souche de *C. trachomatis* serotype A. Cette souche appartient au biovar trachome. Ils ont démontré que l'ajout d'une certaine concentration d'interféron gamma humain (IFN- γ) après infection des cellules, induisait la persistance en produisant des formes chlamydiennes anormales. Ces formes présentent une modification de l'expression d'antigènes chlamydiens avec une synthèse continue de la protéine de stress hsp60 (heat shock protein 60) et une réduction de la synthèse de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP), de la protéine de la membrane externe de 60 kDa et des LPS. L'interféron gamma inhibe la croissance de *C. trachomatis* serotype A par induction

d'indoléamine 2,3-dioxygénase IDO, enzyme catalysant la dégradation du tryptophane (Beatty et coll., 1993). La déplétion du tryptophane exogène corrèle avec l'inhibition de la croissance de *C. trachomatis* serotype A. Les souches persistantes ne sont pas cultivables et sont non infectieuses. Par contre ces formes persistantes conservent leur viabilité. L'infectivité de *C. trachomatis* serotype A est récupérée après la suppression de l'interféron du milieu ou l'addition du tryptophane (Beatty et coll., 1993).

L'effet de l'IFN- γ sur la croissance chlamydienne est concentration-dépendante. Des faibles concentrations d'IFN- γ induisent la persistance tandis que des concentrations élevées d'IFN- γ inhibent complètement la croissance chlamydienne (Beatty et coll., 1993).

1.1.11.6 Évidence de l'existence des souches persistantes in vivo

La persistance chlamydienne a été établie dans une grande variété de systèmes de culture cellulaire. Des évidences indirectes indiquent que des infections persistantes se produisent in vivo et que ces infections persistantes contribueraient à l'immunopathogénèse associée avec les infections oculaires et génitales à *C. trachomatis* (Barbeyrac et coll., 1997).

Dans le cas du trachome, *C. trachomatis* ne peut pas être détecté ni par culture cellulaire ni par des méthodes immunocytologiques dans plus de 20% des cas malgré la présence de manifestations cliniques sévères. On observe une cicatrisation progressive de la maladie, avec une infection inapparente et non productive (culture négative). Ceci semble indiquer que les individus infectés hébergent une forme cryptique de chlamydia à l'intérieur des tissus infectés. La présence de ces formes persistantes est suggérée par le fait que des individus ayant quitté les zones où le trachome est endémique et qui n'ont expérimenté aucun signe de la maladie depuis l'enfance, développent un trachome aigu plusieurs années plus tard. Par conséquent, des Chlamydiae viables, présentes sous forme latente, sous une

forme non-répliquative, contribuent discrètement à la progression de la maladie (Barbeyrac et coll., 1997).

Chlamydia est difficile à isoler en culture cellulaire, principalement lorsque l'infection demeure chronique; la présence d'antigènes chlamydiens et des acides nucléiques sont des indicateurs de la présence des organismes sous forme persistante (Beatty et coll., 1994).

Dans une salpingite expérimentale à *C. trachomatis* produite 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.

Plusieurs études ont identifié la présence d'antigènes chlamydiens dans des spécimens endometriaux et tubaires présentant une culture négative chez des femmes stériles (Campbell et coll., 1993; Theijls et coll., 1991).

Une autre preuve de la présence continue de *C. trachomatis* dans ces formes "culture négative", vient de la mise en évidence d'ADN dans les écouvillonnages oculaires aussi bien chez les trachomateux que dans les modèles expérimentaux. Étant donné la labilité de l'ARN, l'identification d'ARN dans les tissus indique que *C. trachomatis* peut exister sous une forme viable mais non cultivable (Holland et coll., 1992). La longue persistance de *Chlamydia* viables dans les infections chroniques est confirmée par la démonstration de la présence d'ADN et mêmes d'ARN de *Chlamydia* dans les articulations de patients atteints d'arthrite réactive ou d'oligoarthrite indifférenciées (Rahman et coll., 1992), et la présence de *C. pneumoniae* dans les artères coronaires de patients atteints de pathologie cardiaque (Barbeyrac et coll., 1997.). D'autres évidences suggérant la persistance in vivo viennent de l'existence d'infections persistantes à *C. trachomatis* chez des enfants pendant plus de deux ans (Bell et coll., 1986) et d'une infection persistante avec des souches LGV pendant plus de vingt ans chez des personnes n'ayant probablement pas été réinfectées (Dan et coll., 1980).

La notion de persistance a deux conséquences, l'une sur le diagnostic et l'autre sur le traitement. Le diagnostic se fait par la mise en évidence de la bactérie dans les tissus infectés. Comme on l'avait dit auparavant le terme persistance correspond à une association bactérie-hôte dans laquelle la bactérie est viable mais non cultivable. La culture peut donc être faussement négative. Le diagnostic peut aussi se faire par la recherche d'antigènes chlamydiens au moyen de techniques d'immunofluorescence. Ces techniques utilisent des anticorps anti-MOMP ou anti-LPS. Plusieurs études ont démontré que les souches persistantes ont des taux réduits de MOMP et des LPS. Les techniques d'immunofluorescence peuvent donc ne pas détecter toutes les formes persistantes. Tout cela implique la mise au point de techniques permettant d'identifier les formes persistantes comme par exemple la détection des acides nucléiques tels que les ARNm ou les ARNr (Khan et coll., 1996; An et coll., 1992; Cheema et coll., Holland et coll., 1992), ou la mise au point d'anticorps dirigés contre des antigènes synthétisés au cours de l'infection persistante comme l'hsp60 (Beatty et coll., 1993).

Concernant le traitement, il est certain qu'un traitement précoce des infections a plus de chance de réussite qu'un traitement pendant la phase chronique. Il y a plusieurs raisons pour soupçonner que les Chlamydiae à l'état persistant ne soient pas aussi sensibles aux antibiotiques que les formes normales. Premièrement, les formes persistantes contiennent des taux réduits de MOMP (Beatty et coll., 1993). La MOMP, non seulement joue un rôle d'antigène mais aussi elle possède une fonction comme porine (C De Sa., 1996). En l'absence de la MOMP, les grosses molécules hydrophiles, incluant beaucoup d'antibiotiques, pourraient ne pas être transportées à l'intérieur des Chlamydiae (Beatty et coll., 1994). Deuxièmement, la persistance est une réponse au stress et ces réponses sont connues pour induire une sensibilité moindre aux antibiotiques des bactéries (Beatty et coll., 1994). Le traitement des infections chlamydiennes persistantes pourrait donc

nécessiter l'utilisation de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles formulations d'antibiotiques déjà existants.

1.1.11.7 Signification clinique

La persistance est un facteur important de la pathogénèse chez *Chlamydia*. Une proportion élevée des personnes avec des infections chlamydiennes ont des infections extrêmement fréquentes (Batteiger et coll., 1989).

Des infections répétées pourraient jouer un rôle dans la stimulation de la réponse immunitaire et une augmentation des dommages pathologiques (Brunham et coll., 1994).

Les infections oculaires et génitales à *C. trachomatis* peuvent persister pendant des mois en absence d'un traitement adéquat (Beatty et coll., 1994). Ces infections sont souvent asymptomatiques.

Chez les adolescentes, des infections génitales fréquentes ont été associées avec des plus hauts risques de maladie inflammatoire pelvienne (Brunham et coll., 1994).

Approximativement 70 % des femmes avec des cervicites persistantes ne présentent aucun symptôme apparent durant des mois ou même des années. Sans traitement cette infection peut progresser et provoquer une salpingite et une endométrite. Ces dernières ne sont révélées que par leurs conséquences : stérilité, une grossesse extra-utérine et des douleurs pelviennes chroniques (Barbeyrac et coll., 1997).

1.2 Facteurs de risque

Les infections à *C. trachomatis* chez l'homme et la femme sont répandues mondialement. L'incidence des infections génitales est variable selon les populations, l'activité sexuelle et l'âge. Les facteurs de risque de l'acquisition d'une infection à *C. trachomatis* incluent l'âge inférieur à 25 ans, la multiplicité des partenaires sexuels, un nouveau partenaire, une histoire antérieure de MTS, la non-utilisation d'une contraception de type barrière mécanique ou chimique et enfin les enfants nés de mère porteuse d'une infection à *C. trachomatis* (Stamm et coll., 1990; Vanwaeyenbergh, 1993).

1.3 Diagnostic bactériologique

On dispose de techniques de diagnostic reposant ou non sur les cultures cellulaires.

1.3.1 Culture cellulaire

La culture cellulaire est venue remplacer l'inoculation à l'œuf embryonné de poule par voie intravitelline, il y a une quinzaine d'années. Deux lignées sont habituellement utilisées pour *C. trachomatis*, les cellules McCoy et les cellules HeLa 229.

La culture cellulaire reste la méthode de référence à laquelle doivent être comparés les résultats obtenus par toute autre méthode. Elle a une spécificité de 100 %, mais une sensibilité extrêmement variable d'un laboratoire à l'autre (80 à 95%) en raison de l'impossibilité de standardiser toutes ses étapes. (Vanwaeyenbergh, 1993).

La sensibilité de la culture a été améliorée par l'étape de centrifugation, par l'étape de blocage de la multiplication cellulaire par le cycloheximide et enfin par l'utilisation d'anticorps monoclonaux fluorescents pour la révélation des inclusions intracytoplasmiques

(Barbeyrac et coll., 1997). Les passages aveugles multiples augmentent également les chances d'isoler les Chlamydiae (Jones et coll., 1986).

Après 48 à 72 h d'infection, les tapis cellulaires infectés sont colorés à l'iode, au May-Grünwald Giemsa ou mieux encore, par des anticorps monoclonaux fluoromarqués reconnaissant la MOMP ou les LPS chlamydiens.

La réussite de la culture dépend fortement de la qualité du prélèvement, du transport et de l'expérience du personnel du laboratoire. Les inconvénients de la culture résident dans le délai entre le prélèvement et le diagnostic ainsi que dans la lenteur des manipulations de laboratoire. L'avantage majeur reste la spécificité absolue et la possibilité de conservation des micro-organismes pour des études de génotypage et de sensibilité aux antibiotiques (Black, 1997).

1.3.2 Test de détection des antigènes

Ces tests ne dépendent pas des cultures cellulaires. Le transport des échantillons est dès lors moins délicat mais la réussite du test dépend de la qualité du prélèvement chez le patient.

1.3.2.1 Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Cette technique immuno-enzymatique utilise un anticorps mono- ou polyclonal marqué avec une enzyme. L'enzyme agit sur le substrat en donnant un produit coloré. L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie. Les inconvénients majeurs de ces tests sont la subjectivité de la lecture, leur manque de sensibilité et parfois leur manque de spécificité (Vanwaeyenbergh, 1993; Black, 1997).

De nombreux tests sont commercialisés pour mettre en évidence les Chlamydiae par ELISA entre autres : les tests Chlamydiazyme (Abbott Diagnostic) et Microtrak EIA (Behring). Le temps de réalisation de ces tests varie entre 3 et 4 h (Black, 1997).

1.3.2.2 Immunofluorescence directe

C'est une technique simple et rapide dans laquelle l'antigène détecté peut être soit la MOMP, soit le LPS. Par contre, l'utilisation d'anticorps anti-LPS est beaucoup moins spécifique que celle des anticorps anti-MOMP. Après fixation du frottis sur lame, on dépose l'anticorps marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine qui se fixe sur les Chlamydiae. Par rapport à la culture, la spécificité de cette méthode varie de 98 à 100 % et la sensibilité est comprise entre 80 et 90 %. Cette technique a l'avantage d'être très rapide, avec un temps d'exécution inférieur à 1 h. La technique a l'inconvénient de mettre en évidence des bactéries aussi bien vivantes que mortes et de pouvoir donner des résultats faussement positifs par réactions croisées avec d'autres bactéries (Black, 1997).

1.3.3 Test de détection des acides nucléiques

1.3.3.1 Test d'hybridation d'acide nucléique (sondes d'ADN)

Une sonde chimioluminescente d'ADN qui est complémentaire d'une séquence spécifique de l'ARN ribosomal (rRNA) de *C. trachomatis* peut s'hybrider avec un rRNA de *Chlamydia* présent dans l'échantillon. Les hybrides ADN/rRNA sont adsorbés sur des particules magnétiques et mises en évidence dans un luminomètre. Ceci donne un résultat quantitatif.

La sensibilité de cette technique varie de 60 à 95 % selon les auteurs et la méthode de référence, culture ou PCR. (Black, 1997).

1.3.3.2 Diagnostic de *Chlamydia trachomatis* par PCR.

Le PCR est la technique la plus utilisée pour l'amplification des acides nucléiques chlamydiens. Le choix de la cible d'amplification peut porter sur des séquences de l'ADN chromosomique, de l'ADN plasmidique, des ARNr ou des ARNm.

L'amplification de l'ADN par PCR présente des avantages, notamment celui de travailler avec des échantillons de nature très diverse et n'ayant pas toujours suivi une chaîne de froid rigoureuse. Les résultats sont plus fiables que ceux des autres techniques de diagnostic.

Le plus souvent la cible d'amplification est définie sur le plasmide; en effet, celui-ci est très conservé dans toutes les souches humaines et présente l'avantage d'être présent en multiples copies. La sensibilité de la technique est ainsi meilleure.

Le manque de fiabilité des techniques rapides de diagnostic et la difficulté de l'isolement sur culture cellulaire de *C. trachomatis* expliquent pourquoi *C. trachomatis* est l'une des premières bactéries à avoir bénéficié du diagnostic de routine par PCR dans certains laboratoires de biologie médicale (Black, 1997).

Deux tests de PCR sont disponibles sur le marché : le test Amplicor (Roche Diagnostic) et le test Ligase chain reaction ou LCR (Abbott). Ces tests détectent le plasmide de *C. trachomatis*. La spécificité du test Amplicor varie de 92 à 96 % tandis que celle du test LCR varie de 87 à 98 %. Pour ce qui est de la sensibilité, elle est comprise entre 98 et 100% pour le test Amplicor et 99 à 100% pour le test LCR.

1.4 Sensibilité aux antibiotiques

Étant donné le cycle de développement particulier des Chlamydiae, les antibiotiques susceptibles d'avoir une activité bactéricide doivent traverser plusieurs membranes, celles de la cellule hôte, celles de la vacuole et celles de la bactérie. Celles-ci limitent l'éventail des antimicrobiens qui peuvent être utilisés pour lutter contre les chlamydioses (Barbeyrac et coll., 1997).

Les cyclines, les macrolides et les fluoroquinolones sont les antibiotiques les plus couramment utilisés. Des cas d'échecs thérapeutiques ont été rapportés. Il a été fait cas aussi de résistance in vitro à l'érythromycine (Mourad et coll., 1980) et à la tétracycline (Jones et coll., 1990), cependant les mécanismes de résistance impliqués restent inconnus.

Le traitement des infections chlamydiennes est long, nécessite de multiples doses et certains de ces antibiotiques ont des effets secondaires indésirables, ce qui a comme conséquence majeure le manque d'adhésion aux prescriptions, spécialement pour les individus asymptomatiques ou qui manifestent peu de symptômes.

Des doses insuffisantes ou une thérapie trop courte peuvent résulter en une élimination incomplète de l'organisme, avec une inhibition temporaire de la croissance chlamydienne permettant ainsi une rechute subséquente et une émergence de la résistance des Chlamydiae aux antibiotiques.

Il a été aussi montré que même en présence de multiples doses bactéricides in vitro, *C. trachomatis* peut rester sous forme latente, persistante viable, peu ou pas sensible aux antibiotiques sous leurs formes d'administration habituelle et provoquer ultérieurement des récurrences avec des graves conséquences immunopathologiques (Dailloux et coll., 1992; Beatty et coll., 1994).

La doxycycline qui appartient à la famille des tétracyclines continue à être l'antibiotique de choix, parce que des doses moins fréquentes sont requises pour le traitement.

La rifampicine est l'antibiotique le plus actif contre les Chlamydiae. Malheureusement son utilisation reste limitée car des Chlamydiae résistantes à la rifampicine apparaissent rapidement lorsque les souches sont cultivées en présence de concentrations subinhibitrices de rifampicine (Treharne et coll., 1989).

Pour évaluer la sensibilité des souches in vitro, on détermine en culture cellulaire, des concentrations minimales d'antibiotiques inhibant la formation des inclusions. Ces techniques sont longues, délicates et non standardisées et ne peuvent être réalisées que dans des laboratoires spécialisés bien entraînés à la culture cellulaire. La bactéricidie est pour les Chlamydiae difficile à déterminer (Dailloux et coll., 1992).

1.5 Traitement

Étant donné le cycle de développement chlamydien relativement long, 48 à 72 h, le traitement des infections à *C. trachomatis* doit être suffisamment long pour que les micro-organismes soient détruits (Stamm, 1999).

Les tétracyclines, les macrolides et plus récemment certains fluoroquinolones, sont les antibiotiques de choix pour le traitement des chlamydioses (Jones, 1991; Ridgway, 1997).

La doxycycline, administrée deux fois par jour, à raison de 100 mg par comprimé, pendant 7 jours, reste le traitement de choix, d'autant plus que la diffusion tissulaire est supérieure aux autres tétracyclines. En cas d'allergie, de grossesse ou d'intolérance aux tétracyclines, l'érythromycine 500mg, 4 fois par jour, pendant 7 jours, reste un bon deuxième choix pour le traitement des infections chlamydiennes (Morisset, 1990).

Les taux de pénétration et les concentrations cellulaires très élevés de l'azithromycine, ainsi que son temps de demi-vie prolongé, favorisent son utilisation en dose unique dans le traitement des infections chlamydiennes non compliquées (Jones, 1991; Stamm, 1999).

Si l'on veut éradiquer une chlamydiose comme toute autre infection transmise par voie sexuelle, il est primordial de traiter non seulement le malade mais également son ou ses partenaires et de les suivre après traitement afin d'éliminer toute MTS. Tout malade ayant été traité pour une infection à chlamydia devrait subir des examens de contrôle trois semaines après le traitement, afin d'éviter les rechutes aussi bien que les ré-infections (Morisset, 1990).

Le traitement de la lymphogranulomatose vénérienne se fait par la doxycycline (200mg/j) ou en cas d'intolérance ou grossesse, l'érythromycine (500mg/ 4 fois / jour), ces antibiotiques étant prescrits pendant 21 jours (Morisset, 1990).

Dans le cas du trachome le traitement comprend l'application topique d'antibiotiques (pommade à l'érythromycine ou aux cyclines) 5 à 10 jours par mois, pendant 6 mois. Dans les formes sévères, on associe au traitement local un traitement par voie générale (cyclines) pour une durée de trois semaines.

1.6 Liposomes

1.6.1 Généralités

Malgré la disponibilité d'une grande variété d'antibiotiques, le traitement de certaines infections bactériennes reste sans succès. L'échec de tel traitement pourrait être le résultat de la localisation intracellulaire du microorganisme, l'antibiotique ne pourrait pas pénétrer les cellules infectées à une dose suffisamment élevée pour éliminer le pathogène.

Des doses relativement élevées sont souvent requises pour obtenir des concentrations efficaces qui pénétreraient les cellules cibles mais qui pourraient affecter aussi les cellules saines causant une cytotoxicité indésirable (Poznansky et coll., 1984). Un médicament idéal devrait pouvoir atteindre la cellule cible à traiter et épargner les cellules saines qui les entourent (Juliano et coll., 1980).

Il est généralement accepté que beaucoup des médicaments utilisés en thérapeutique, diagnostic et médecine préventive pourraient être très utiles si ces derniers exerçaient sélectivement leur effet désiré sur le site cellulaire cible (Gregoriadis, 1989). Diverses stratégies ont été utilisées pour cibler le médicament au site cible, notamment l'utilisation d'un vecteur. Différents vecteurs ont été utilisés tels que des conjugués, de l'albumine, des anticorps monoclonaux, des lectines, des glycoprotéines, de l'ADN recombinant, de dextran, des nanoparticules et des liposomes (Gregoriadis, 1979; Donamura et Warner, 1985; Albertsson et coll., 1985; Tirrell et coll., 1985).

Les liposomes sont de bons vecteurs colloïdaux d'antimicrobiens qui ont été expérimentés contre des agents intracellulaires parasitaires, fongiques, bactériens et viraux (Lopez-Berestein et coll., 1987; Phillips et coll., 1991). 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 et Ravaoarino, 1998).

Les liposomes ont permis de réduire la toxicité et les doses des drogues, de les protéger de la dégradation enzymatique et l'inactivation immunologique et chimique, de faciliter leur transport vers les sites sélectifs d'action, d'accroître leur pénétration intracellulaire et d'y prolonger leurs activités antimicrobiennes.

1.6.2 Définition

Les liposomes ont été décrits pour la première fois par Bangham et ses collaborateurs en 1965, lorsqu'ils ont démontré que les phospholipides dans l'eau forment spontanément des vésicules fermées. Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques de structure lamellaire. Ces phospholipides ont une extrémité hydrophobe et une autre hydrophile disposées en bicouche (Bangham et coll., 1974).

1.6.3 Propriétés

Bien que la plupart des liposomes soient de forme sphérique, la composition lipidique, la température et la méthode de préparation utilisée déterminent leur forme finale, leur taille et le nombre de bicouches lipidiques (Sharata et coll., 1996).

Les liposomes possèdent la propriété d'incorporer des substances, ce qui leur confère aussi un intérêt grandissant comme modèle artificiel des membranes cellulaires. Les substances hydrosolubles seront incorporées dans l'espace aqueux interne, tandis que les substances liposolubles seront enchâssées dans la bicouche lipidique (Ravaoarino et coll., 1993).

La composition lipidique et la méthode de préparation des liposomes affectent directement l'absorption de la substance, sa distribution, son métabolisme, son élimination ainsi que son profil de toxicité (Sharata et coll., 1996).

La surface des liposomes peut être chargée négativement ou positivement par incorporation des amphiphiles chargés pour ainsi modifier leur perméabilité (Gregoriadis et coll., 1993).

Les liposomes de charge positive (ex. : phosphatidylcholine + stéarylamine) sont imperméables aux cations, tandis que les liposomes de charge négative (ex. : phosphatidylcholine + acide phosphatidique) sont perméables aux cations. Les liposomes neutres (ceux non chargés) sont perméables à l'eau, aux ions et à des solutions non-électrolytes (Ravaoarino, 1993).

1.6.4 Classification

Les liposomes sont classés selon la nature et le nombre de leurs bicouches lipidiques et de leur taille (Juliano, 1981; Puisieux, 1983; Marchal-Heussler et coll., 1990) :

- les petites vésicules unilamellaires (SUV) (20 nm à 50 nm de diamètre),
- les grandes vésicules unilamellaires (LUV) (200 à 1000 nm de diamètre),
- les vésicules multilamellaires (MLV) (400 à 3500 nm de diamètre).

1.6.5 Méthodes de préparation des liposomes

Plusieurs phospholipides peuvent être utilisés pour préparer les liposomes : phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, phosphatidyléthanolamine, sphingomyéline (Ravaoarino et coll., 1993). Les deux principaux composants de la plupart des

membranes des plantes et des animaux sont le phosphatidylcholine (aussi appelé lécithine), et le phosphatidyléthanolamine (Vemuri et coll., 1995).

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la préparation des liposomes. La méthode classique de Bangham est la plus simple et la plus souvent utilisée (Bangham, 1968; Bangham et coll., 1974; Sato et Sunamoto, 1992; Gregoriadis, 1993).

Des lipides en présence d'un solvant organique, en l'occurrence le chloroforme, sont mélangés dans un ballon rotatif à fond rond puis évaporés sous une pression réduite et forment un film très mince. Les liposomes sont ensuite formés spontanément en ajoutant au film lipidique une solution aqueuse de la substance à encapsuler. Les liposomes préparés par cette méthode sont habituellement hétérogènes en taille. Il est possible d'ajuster la taille moyenne des vésicules par sonification, par dialyse, par microfluidisation, par homogénéisation (Gregoriadis, 1993).

Il existe d'autres méthodes de préparation des liposomes telles que la dialyse par détergent (Deamer et coll., 1983), l'injection par l'éthanol (Macdonald et coll., 1983) et éther (Deamer et coll., 1976), la déshydratation-réhydratation (Kirby et Gregoriadis, 1984; Mayer et coll., 1985; Kirby, 1993), l'extrusion à haute pression (Hope et coll., 1985) et l'évaporation en phase-inverse (Szoka et coll., 1978).

Les substances non encapsulées peuvent être éliminées par plusieurs méthodes entre autres la dialyse, l'ultracentrifugation, la filtration sur gel, les procédés d'échangeurs d'ions (Szoka et coll., 1980; Lichtenberg et coll., 1988; Karlowsky et coll., 1992).

1.6.6 Stabilité des liposomes

Le principal problème dans l'utilisation des liposomes comme vecteur d'antibiotiques, c'est leur instabilité dans la circulation sanguine à cause de l'absorption macromoléculaire, l'oxydation, l'hydrolyse et l'échange lipidique.

L'addition des gangliosides ou des polyéthylèneglycols augmente de façon significative la demi-vie des liposomes (Allen et coll., 1987; Gabizon et coll., 1988; Senior et coll., 1991).

Les phospholipides naturels contiennent principalement des chaînes carbonées non-saturées et sont très sensibles aux oxydations (Montfoort et coll., 1987). L'oxydation peut être évitée en incorporant des antioxydants dans les liposomes (Hunt et coll., 1981; Kirby, 1993).

L'hydrolyse des phospholipides des liposomes peut être évitée ou ralentie grâce à l'utilisation de cholestérol et des phospholipides saturés (Kirby, 1993).

Quant à la perte des médicaments résultant des fuites et d'échange lipidique entre liposomes et les protéines plasmidiques (opsonines et les lipoprotéines de haute densité), on peut y remédier en manipulant la composition lipidique appropriée et en additionnant un excès de cholestérol à la membrane des liposomes (Gregoriadis, 1985).

L'ajout de cholestérol améliore la fluidité de la bicouche membranaire, réduit la perméabilité des molécules solubles dans l'eau à travers la membrane et améliore la stabilité de la bicouche membranaire des liposomes en présence des protéines plasmatiques (Vemuri et coll., 1995).

1.6.7 Dosage des antibiotiques encapsulés dans les liposomes

La concentration d'antibiotique encapsulé dans un type de liposome doit être déterminée avant de pouvoir faire son utilisation. La méthode de dosage microbiologique, est une méthode simple qui n'est pas coûteuse et qui ne demande pas un équipement de laboratoire spécial. La méthode consiste à inoculer avec différentes dilutions de l'antibiotique libre et sous forme liposomale un milieu gélosé contenant une souche de référence contrôle sensible à l'antibiotique à doser. Les souches les plus souvent utilisées sont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Bacillus subtilis*.

Des puits sont percés dans la gélose et les différentes dilutions d'antibiotique à tester y sont déposées. Après une période d'incubation, les diamètres d'inhibition obtenus sont mesurés et une courbe d'étalonnage de la concentration d'antibiotique libre en fonction du diamètre d'inhibition obtenu est tracée. La courbe d'étalonnage doit être effectuée avec des concentrations connues d'antibiotique sous forme libre.

La concentration inconnue de l'échantillon (antibiotique encapsulé) est déterminée en extrapolant sur la courbe d'étalonnage les valeurs des zones d'inhibition obtenues pour chaque dilution d'antibiotique et ainsi déterminer les concentrations d'antibiotique.

1.6.8 Les interactions liposomes-cellules.

L'interaction liposomes-cellules peut se faire par 4 mécanismes différents : 1) par adsorption des liposomes à la surface des cellules, 2) par endocytose, 3) par échange lipidique entre la paroi des vésicules et la membrane cellulaire et 4) par fusion membranaire où la cellule intègre dans sa membrane les composantes de la membrane liposomiale (Ostro, 1987; Elorza et coll., 1993).

Seules l'endocytose et la fusion semblent être les deux mécanismes majeurs d'interaction avec la cellule (Scherphof, 1991).

1.6.9 Toxicité des liposomes

Étant donné leur similarité à la membrane cellulaire, les liposomes ne sont pas toxiques, ils sont biodégradables, inertes au point de vue biochimique et non-immunogènes (Ravaoarino, 1993).

Afin d'étudier la toxicité des liposomes, plusieurs études ont été entreprises en injectant des doses uniques de liposomes de différentes tailles, compositions et doses. Administrés *in vivo* selon différentes voies, les liposomes n'ont montré aucun effet toxique (Allen, 1988).

1.6.10 Applications des liposomes

1.6.10.1 Applications des liposomes *in vitro*

Les antibiotiques sous forme liposomale sont utilisés dans le traitement de certaines infections intra- ou extra-cellulaire bactériennes, fongiques, parasitaires et virales qui résistent à la thérapie conventionnelle ou quand cette thérapie a une toxicité élevée (Ravaoarino, 1993).

Plusieurs études ont démontré que l'activité des antibiotiques encapsulés dans les liposomes est augmentée et que leur toxicité est réduite.

L'administration d'antibiotiques sous forme liposomale à des macrophages péritonéaux de souris infectées par *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* in

in vitro a montré que l'activité des antibiotiques encapsulés a été augmentée (Bonventre et coll., 1978; Stevenson et coll., 1983).

L'activité d'autres antibiotiques tels que l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine et la tobramycine est aussi augmentée par leur incorporation dans les liposomes sur des souches de *Brucella* sp. localisées dans les macrophages péritonéaux de souris (Fountain et coll., 1985).

1.6.10.2 Applications des liposomes in vivo

Le premier succès notable de l'utilisation des antibiotiques incorporés dans les liposomes a été obtenu dans le traitement des modèles animaux (chien, hamster, singe) de leishmaniose viscérale. Les médicaments disponibles pour traiter cette infection sont d'usage limité à cause de leur toxicité rénale, cardiaque et hépatique. L'utilisation des médicaments tels que le 3-aminoquinoléine, amphotéricine B, griséofulvine, 5-fluorocytosine sous forme liposomale a augmenté l'activité thérapeutique de 35 à 40 fois chez les animaux infectés (Neu et coll., 1981; Chapman et coll., 1984; Berman et coll., 1986).

Dans des infections expérimentales à *Mycobacterium tuberculosis* chez les souris, l'infection a été traitée avec succès par la streptomycine liposomale. Il en est de même dans le cas de l'infection expérimentale par *Legionella* chez des hamsters (Vladmirsk et coll., 1982; Sunamoto et coll., 1984) et de *Listeria monocytogenes* traités avec l'ampicilline liposomale (Bakker et coll., 1985).

L'amphotéricine B est l'antibiotique de choix dans le traitement des infections fongiques systémiques tels que celles à *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* et *Cryptococcus neoformans* (Graybill et coll., 1982; Taylor et coll., 1982; Lopez-Berestein et coll., 1983; Tremblay et coll., 1984). L'utilisation de l'amphotéricine B est limitée par sa forte

toxicité, qui peut être diminuée par son incorporation à l'intérieur des liposomes (Juliano et coll., 1983; Mehta et coll., 1985). L'incorporation de l'amphotéricine B dans les liposomes permet d'administrer une dose 10 fois plus grande que celle de l'amphotéricine libre, sans avoir des effets toxiques aigus chez des souris neutropéniques infectées par *Candida albicans* (Tremblay et coll., 1984; Lopez-Berestein et coll., 1983). Des résultats similaires ont été obtenus en infectant des souris respectivement avec *Cryptococcus neoformans* et *Histoplasma capsulatum* (Graybill et coll., 1982; Taylor et coll., 1982).

1.6.10.3 Autres applications des liposomes

D'autres substances peuvent être incorporées dans les liposomes telles que :

- adjuvants, dans les études d'immunisation et de production d'anticorps (Allison, 1974; Gregoriadis et coll., 1987)
- des antigènes (anatoxines diphtérique et tétanique, la toxine cholérique, etc.) (Davis et coll., 1987)
- des anticancéreux (avridine, doxorubicine, etc.)(Gregoriadis et coll., 1993)
- des agents chélateurs (Rahman et coll., 1975)
- des enzymes (Baker et coll., 1992)
- des vaccins et du matériel génétique (Gregoriadis et coll., 1985; Smith et coll., 1993)
- des antiviraux (SIDA) (Phillips, 1992; Wasan et coll., 1995)

Les liposomes ont aussi été utilisés comme modèle membranaire dans l'étude de la perméabilité, transport, thermodynamique, peroxydation des lipides, fluidité, etc.

1.6.11 Conclusion

Plusieurs travaux ont démontré que l'utilisation des liposomes comme vecteur des médicaments, améliore leurs profils pharmacologique et pharmacocinétiques, réduit leur toxicité, et accroît leur indice thérapeutique dans le traitement des infections expérimentales in vitro et in vivo. Par ailleurs, quelques problèmes restent à régler avant l'utilisation des liposomes chez l'humain. Ces problèmes comprennent la standardisation de la composition lipidique des vésicules, les techniques de préparation, leur stabilité, la pyrogénicité, la stérilité, la production à grande échelle et leurs effets éventuels sur l'organisme.

Il est bon de noter, que les liposomes ne sont pas les seuls vecteurs de médicaments disponibles présentement. La gélatine, le dextran, l'albumine, etc., présentent les mêmes propriétés que les liposomes, et de plus paraissent faciles à préparer.

Matériel et méthodes

2.1 Souches chlamydiennes

Dans le cadre du présent projet de recherche, 3 sérotypes de *C. trachomatis* fournis par le Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ) et ayant des pouvoirs pathogènes différents ont été sélectionnés afin d'évaluer les possibilités de les induire dans un état de persistance par l'IFN- γ dans un modèle cellulaire in vitro. Les sérotypes sélectionnés sont :

BIOVAR	SÉROTYPE	POUVOIR PATHOGÈNE
TRACHOMA	A	Trachome endémique
	D	Infections oculaires et génitales
LGV	L2	Lymphogranulomatose vénérienne

2.2 Souches cellulaires

Pour la culture des Chlamydiae les cellules HeLa 229 ont été utilisées. C'est une lignée de cellules épithéliales humaines isolée en 1951, d'un carcinome du col utérin. Les cellules HeLa sont une lignée continue. Elles ont la capacité de se multiplier pratiquement à l'infini car elles sont insensibles au phénomène d'inhibition de contact qui limite la prolifération de cellules en culture primaire.

2.3 Milieux de culture

Le milieu essentiel minimal (MEM) a été utilisé pour la culture des cellules HeLa 229. Ce milieu contient aussi les sels de Hanks, de la L-glutamine, les acides aminés non essentiels (Gibco BRL) et 0,35 g/l de bicarbonate de sodium, additionné de 10% de sérum fœtal de veau (PAA Laboratories).

Le milieu de maintien pour les cultures cellulaires est le MEM avec les sels de Hanks additionné de 2 % de sérum fœtal de veau.

Le milieu de culture pour la croissance des Chlamydiae est le même que celui des cultures cellulaires avec la différence qu'il contient un inhibiteur de la croissance cellulaire, le cycloheximide (Sigma), à une concentration de 0,5 µg/ml.

2.4 Réactifs

2.4.1 Antibiotiques

Les antibiotiques suivants ont été achetés de la compagnie Sigma-Aldrich Canada, Mississauga, On. :

- la doxycycline
- l'érythromycine
- la rifampicine

2.4.2 Produits chimiques

Les produits chimiques ont été fournis par les compagnies suivantes:

American chemicals Ltd, Mtl., Québec

- Le phosphate de sodium monobasique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$)
- L'acide acétique glacial (CH_3COOH)
- Le chlorure de sodium (NaCl)
- Le phénol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)

Avanti Polar Lipids Birmingham, AL, USA

- Les phospholipides pour la préparation des liposomes

Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca.

- Le colorant concentré pour le dosage des protéines
- Le N,N'-méthylène bisacrylamide (BIS)
- L'acrylamide ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$)
- L'albumine sérique bovine (ASB)

Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ.

- Le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4)
- Le phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4)
- Le saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
- L'hydroxyde de sodium (NaOH)
- Le chlorure d'hydrogène (HCl)

J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ.

- Le phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4)

LKB Produkter, AB, Bromma, Sweden

- Le bleu de bromophénol

Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo.

- La glycine ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)
- Le 2-mercaptoéthanol
- Le N,N,N,N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)
- Le persulfate d'ammonium (APS)
- La ribonucléase A (RNase)
- Le trisma hydrochloride (Tris-HCl)

- L'isopropanol ($\text{CH}_3\text{COH}_2\text{CH}_3$)
- L'éthylènediamine-acide tétraacétique (EDTA)
- Le N-lauryl Sarcosinate (Sarkosyl)
- Le sodium dodécyl sulfate (SDS)
- L'acétate de potassium
- Le chloroforme
- L'alcool-iso-amylque
- Le tris hydroxyméthyl aminométhane ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Trisma base)
- Le triton X-100
- L'acide glutamique
- Le cycloheximide

2.4.3 Électrophorèse

2.4.3.1 Gel d'agarose

Les réactifs nécessaires pour effectuer l'électrophorèse en gel d'agarose sont les suivants :

- Le tampon TAE 50X contient 242 g de Tris-Base, 57,1 ml d'acide acétique glacial, 200 ml d'EDTA 0,5 molaire à un pH de 8,0 et 742,9 ml d'eau déionisée stérile.
- Le tampon d'échantillon 6X est composé de 0,25% p/v de xylène cyanol, 0,25% p/v de bleu de bromophénol dans 40% (v/v) de glycérol dans de l'eau déionisée stérile.
- Une solution concentrée à 1 mg/ml de bromure d'éthidium est préparée dans de l'eau déionisée stérile et ajoutée à une concentration finale de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans le gel et le tampon TAE 1X.

2.5 Appareils

- Le pHmètre, Corning Scientific Instruments, Modèle 10
- L'autoclave AMSCO Laboratoires, Canada
- La balance de précision, Sartorius, Werke GMBH 2400
- Le polaroid, Fisher Scientific
- Le transilluminateur UV (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ)
- La centrifugeuse RC2-b (rotor : SS34) Sorvall
- L'ultracentrifugeuse TL-70, Beckman, Palo Alto, Ca
- L'ultracentrifugeuse TL-100, Beckman, Palo Alto, Ca
- Le sonicateur BraunSonic 2000; Braun Instruments, Burlingame, Ca
- L'évaporateur rotatif Buchi –Rotavapor-R KP Brinkmann, Toronto, Ontario, Canada

2.6 Culture cellulaire

Les cellules HeLa 229 ont été mises en culture dans des flacons de 25 cm². Le milieu utilisé pour la croissance des cellules a été le milieu MEMH (minimal essential medium + sels de Hanks + 10 % de SFV).

Les cellules ont été incubées à 37°C dans une étuve à CO₂ (5% CO₂) jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire confluent (2 à 5 jours).

Des sous-passages sont effectués dans des flacons de 25 cm² quand le feuillet cellulaire devient confluent. Lorsqu'on obtient une bonne croissance cellulaire (3^{ieme}-4^{ieme} passage) les passages subséquents sont effectués dans des flacons de 75cm².

2.7 Trypsination des feuillets confluents

Pour faire la propagation des cellules à partir d'un feuillet cellulaire confluent, il faut tout d'abord faire la dissociation des cellules. Pour dissocier les cellules on utilise une enzyme protéolytique, la trypsine à une concentration de 0,25% dans du PBS sans Ca^{++} et sans Mg^{++} . Ces ions augmentent la stabilité de la matrice intracellulaire et interfèrent ainsi avec l'action de la trypsine. Après avoir enlevé le milieu de culture du flacon, on rince le tapis cellulaire avec 6 ml de trypsine pour enlever les traces de milieu de culture. Ce milieu de culture pourrait inactiver l'action de l'enzyme. Ensuite, on enlève la solution de lavage du flacon et on ajoute 4 ml de trypsine. On laisse les cellules en contact avec l'enzyme pendant 30s à 1 min puis on enlève 2 ml de trypsine et on laisse le feuillet cellulaire se détacher. Les flacons sont placés dans une étuve à 37°C pour laisser les cellules se détacher complètement du flacon.

Ensuite on ajoute 10 ml de milieu de culture cellulaire pour arrêter l'action de la trypsine. On disperse les agrégats cellulaires en aspirant et en refoulant la suspension dans le flacon. On obtient ainsi une suspension homogène de cellules dans du milieu de culture.

2.7.1 Congélation et conservation des cellules

Après trypsination des feuillets cellulaires confluents, le décompte des cellules a été effectué et le taux de viabilité cellulaire a été déterminé par le test d'exclusion au bleu de trypan (solution de 0,4 (p/v) de bleu de trypan préparée dans la solution saline de NaCl à 0,85% (p/v)). Dans le test de viabilité par exclusion au bleu de trypan, les cellules viables sont incolores car leur paroi est intacte tandis que les cellules mortes deviennent bleues car

leur paroi est altérée et laisse pénétrer le colorant bleu. Si la concentration de cellules viables baisse en-deçà de 90%, on jette la suspension cellulaire et on recommence une nouvelle culture cellulaire. Les cellules ont été suspendues dans du milieu de congélation (MEM/Hanks + 10% de SFV inactivé + 10% de glycérol stérile) à une concentration comprise entre 10^6 et 10^7 cellules par ml. Des aliquots de suspension cellulaire ont été faits à raison de 1 ml par tube. La congélation des cellules se fait en trois étapes pour éviter la destruction des cellules par la chute trop brusque de température. Tout d'abord les cellules ont été réfrigérées à 4°C pendant 3 h. Par la suite les cellules ont été placées à -25°C pendant 2 h. À la fin de l'incubation les cellules ont été congelées à -70°C. Ces cellules peuvent être ainsi gardées pendant des années.

2.8 Culture et stockage des Chlamydiae

2.8.1 Culture des Chlamydiae sur cellules HeLa 229 dans des flacons de 75 cm².

Des feuillets confluents dans des flacons de 75 cm² sont obtenus dans un intervalle de 48 à 72 h. Dès que la confluence est atteinte le milieu de culture est éliminé des flacons et 10 ml de DEAE-dextran (30µg/ml) sont ajoutés par flacon dans le cas des infections avec des Chlamydiae de biovar trachoma. Les flacons sont incubés 30 min à la température de la pièce. L'inoculum est composé de 1,0 ml de suspension chlamydienne diluée avec 9,0 ml de milieu de culture des Chlamydiae. À la fin de l'incubation le DEAE-dextran est aspiré et 10,0 ml d'inoculum est ajouté par flacon. Ce volume est suffisant pour que le feuillet cellulaire soit entièrement immergé. Les flacons sont incubés à la température du

laboratoire, pendant 2 h 30 min. Les flacons sont agités par moments au cours de cette incubation, à la fin de laquelle le volume du milieu de culture de chaque flacon est complété à 25,0 ml avec du milieu de culture des Chlamydiae frais (MEM + HBSS + 10% de SFV inactivé + cycloheximide 0,5µg/ml).

Au terme de l'incubation à 37°C pendant 48 h (LGV) ou 72 h (Trachoma), le milieu de culture est éliminé et les feuillets cellulaires infectés sont décollés par grattage, à l'aide d'un râteau stérile à usage unique, avec 10.0 ml de SPG (sucrose phosphate glutamate). Les suspensions chlamydiennes sont bien homogénéisées puis réparties en aliquots à raison de 0,5ml par tube et congelés à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2.8.2 Culture des Chlamydiae sur cellules HeLa 229 dans des plateaux de 24 puits

Des feuillets confluent de cellules HeLa 229 propagés dans des plateaux de 24 puits ont été utilisés pour la croissance des Chlamydiae. Pour rendre les cellules HeLa 229 plus susceptibles à *C. trachomatis* les cellules sont prétraitées avec du diéthylaminoéthyl (DEAE)-dextran. Cette substance a pour effet de modifier la charge au niveau de la surface des cellules. Le DEAE-dextran est utilisé pour faciliter l'infection des cellules par les souches de *C. trachomatis* du biovar Trachome. Son utilisation n'est pas nécessaire pour la culture de *C. trachomatis* du biotype LGV (L1, L2, L2a, L3).

Les milieux de culture cellulaire sont enlevés des plateaux et 1ml de DEAE-dextran (30µg/ml) est ajouté sur les feuillets confluent. Les tapis cellulaires ont été laissés en contact avec la solution de DEAE-dextran pendant 30 min à la température de la pièce. Après incubation, le DEAE-dextran est enlevé de chaque puits auquel 0,1 ml d'inoculum

est ajouté. Le volume de chaque puits est complété à 0,5 ml avec 0,4 ml SPG pour couvrir complètement les cellules et éviter ainsi leur dessèchement au cours de la centrifugation. Les plateaux sont centrifugés pendant 1 h à 2200 rpm à 30°C.

À la fin de la centrifugation, l'inoculum de chaque puits est remplacé par 1,0 ml de milieu de culture de Chlamydia [(MEM + HBSS + 10% de SFV inactivé + Cycloheximide (0,5µg/ml) dont la solution mère est à une concentration finale de 1000 µg/ml.]. Les plateaux sont incubés à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂, pendant 48h (LGV) ou 72h (Trachoma). Au terme de l'incubation le milieu de culture est éliminé et les cellules sont décollées par grattage, à l'aide d'un embout, en ajoutant 0,5ml de SPG frais. Les agrégats des cellules infectées sont homogénéisés par aspiration-refoulement et des aliquots de 0,5ml sont congelés à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2.8.3 Titrage des Chlamydiae

Le titrage des Chlamydiae a été effectué dans des plateaux de 24 puits.

Après trypsination des feuilletts confluents d'un flacon de 75 cm², les cellules ont été bien homogénéisées et réparties dans des plateaux de 24 puits contenant des lamelles stériles à raison de 1 ml de suspension cellulaire par puits. Les plateaux sont incubés à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂, pendant 18 à 24 h pour obtenir des feuilletts cellulaires confluents. Pour le titrage des souches du biovar trachome (A et D) 1,0 ml de la solution de DEAE-dextran est ajouté par puits avant l'infection des cellules. L'utilisation de DEAE-dextran n'est par nécessaire pour la culture des souches du biotype LGV (L2). Différentes dilutions de l'inoculum sont effectuées dans du tampon SPG: pur, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000.

L'ancien milieu a été éliminé et 0,4 ml de tampon SPG est distribué par puits auquel sont ajoutés 0,1ml de chaque dilution d'inoculum. Quatre puits sont inoculés pour chaque dilution.

Les plateaux sont centrifugés à 2200 rpm pendant 1 h à 30°C. À la fin de la centrifugation, l'inoculum est éliminé des puits et remplacé par 1,0 ml de milieu de culture des Chlamydiae [(MEM + HBSS + 10% de SFV inactivé + Cycloheximide (0,5 µg/ml)].

À la fin de l'incubation à 37°C, en atmosphère enrichi à 5% de CO₂, pendant 48h (LGV) ou 72h (Trachoma) les lamelles contenant les cellules infectées sont colorées par la méthode May-Grünwald Giemsa et montées sur lame de microscope.

L'infectivité de la souche a été évaluée en comptant sur chaque lamelle colorée, le nombre moyen d'inclusions intracytoplasmiques formées dans 30 champs microscopiques pris au hasard au grossissement 40 X.

2.8.3.1 Calcul des unités formant inclusions (UFI)

La détermination du titre de l'inoculum consiste à convertir le nombre moyen d'inclusions calculé précédemment en unités viables par ml:

$$UV/ml = N \times Z \times f$$

Où N représente le nombre moyen d'inclusions par champ microscopique, Z, le nombre de champs microscopiques sur la couche monocellulaire et f, le facteur de dilution. Dans notre formule $f=10$ car pour chaque dilution initiale, l'inoculum a un volume égal à 0,1 ml. Le nombre moyen de champs microscopiques sur les lamelles que nous utilisons dans notre étude est de 711 (lamelles d'un diamètre de 12 mm et observées à 40X) (voir annexe).

2.9 Préparation de la doxycycline encapsulée dans les liposomes positifs

Des techniques d'encapsulation des antibiotiques dans les liposomes ont déjà été développées dans notre laboratoire (Ravaoarino et coll., 1993) et leur efficacité contre certains agents bactériens a été évaluée *in vitro* (Omri et coll., 1995).

Des études sur la pharmacocinétique et des études sur la toxicité *in vitro* de la doxycycline et de la tétracycline encapsulées dans différentes compositions des liposomes ont été effectuées dans notre laboratoire (Sangaré et coll., 1998). Ces travaux ont démontré que chacune des formulations liposomales a un profil de stabilité différent dans le sérum humain mais que ces formulations ne sont toxiques ni pour les érythrocytes humains ni pour les cellules HeLa 229 en culture cellulaire. L'importance de la stabilité des liposomes tient au fait que si on les utilise *in vivo*, les liposomes doivent résister aux facteurs sériques susceptibles de les dégrader afin d'améliorer la pénétration, l'accumulation et leur activité dans les sites infectés désirés. Des travaux antérieurs (Sangaré et coll., 1998) ont montré des propriétés intéressantes de la préparation de la doxycycline encapsulée dans les liposomes de charge positive, notamment un bon taux d'encapsulation, une bonne stabilité dans le sérum, l'absence de cytotoxicité et une bonne activité antichlamydiennne. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé dans le cadre de notre projet de retenir la forme liposomale de charge positive de la doxycycline et de la comparer avec sa forme libre contre une infection chlamydiennne aiguë et une infection persistante *in vitro*, et voir si cette nouvelle formulation pourra être active sur la forme chlamydiennne persistante.

2.9.1 Préparation des liposomes

Les liposomes ont été préparés par sonication, selon la méthode décrite par Ravaoarino et coll., 1993.

Les liposomes cationiques sont composés d'un mélange de lécithine, de cholestérol et de stéarylamine dans un ratio molaire de 7 : 1 : 2. Chaque composante des liposomes est reconstituée avec 1 ml de chloroforme. Ces solutions sont par la suite transférées dans un ballon à fond rond adaptable sur un évaporateur rotatif (Buchi – Rotavapor-R KP vr 65/45, Brinkmann, Toronto, Ontario, Canada). Chaque ampoule a été rincée avec 1 ml de chloroforme. Les solutions de rinçage ont été ajoutées au contenu du ballon. On obtient ainsi un volume total de 6 ml de suspension lipidique dans le chloroforme. Ensuite, ce dernier a été évaporé dans l'évaporateur rotatif, sous vide à 58°C. On remarque la formation d'un film de lipide sur la paroi interne du ballon. Le film lipidique a été hydraté avec 6 ml de solution de doxycycline [1ml de doxycycline (2mg/ml) dans 5 ml d'eau distillée stérile]. Le mélange a été agité au vortex dans le but de décoller complètement les lipides du fond du ballon. Ce dernier a été ensuite laissé à la température du laboratoire pendant 30 min. Le mélange des lipides a été transféré dans un tube stérile, placé sur de la glace fondante et traité aux ultrasons à une intensité de 12 μ A, pendant 1 min. Les liposomes sont séparés des antibiotiques non encapsulés par centrifugation de la solution des lipides à 40000 rpm (ultracentrifugeuse TL-100, Beckman, Palo Alto, Ca) pendant 45 min, à 4°C.

À la fin de la centrifugation, le surnageant est récupéré et conservé à 4°C. Les liposomes (culot) sont remis en suspension dans 6 ml d'eau distillée stérile et ils sont centrifugés de

nouveau dans les mêmes conditions. Cette dernière étape a été répétée une seconde fois ; à chaque fois les eaux de lavage ont été récupérées et gardées dans le même tube que le surnageant de la première centrifugation. Les liposomes sont finalement remis en suspension dans 6 ml d'eau distillée stérile et ils sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.9.2 Détermination du taux d'antibiotique encapsulé dans les liposomes par la méthode microbiologique.

2.9.2.1 Détermination de la courbe d'étalonnage.

La solution mère de doxycycline a été préparée à une concentration de 2000 µg/ml. Des dilutions sériées de doxycycline sous forme libre ont été faites (1,0 à 512,0 µg/ml) ainsi que des dilutions sériées de doxycycline sous forme liposomale (pur, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) et du surnageant (pur, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16). Le surnageant est composé des eaux de lavages et il est constitué de l'antibiotique non-encapsulé. Les dilutions de la doxycycline sous forme libre seront utilisées pour la détermination de la courbe d'étalonnage.

2.9.2.2 Solutions d'antibiotiques libérée des liposomes.

Les vésicules de liposomes ont été lysées avec 0,2% du Triton X-100 (v/v). Un volume de 0,5ml de la préparation liposomale est mélangé avec un volume égal de 0,2 % de Triton X-100. Le mélange est agité au vortex et laissé reposer 15 min à la température du laboratoire. Après incubation les solutions sont centrifugées à 12000 rpm pendant 5 min, à la température du laboratoire (ultracentrifugeuse TL-100, Beckman, Palo Alto, Ca). À la fin

de la centrifugation le surnageant contenant l'antibiotique libéré est recueilli. Ce dernier est conservé à 4°C, jusqu'au moment de son utilisation.

2.9.2.3 Test microbiologique

Après préparation de la poudre de gélose Mueller-Hinton selon les instructions du manufacturier, la suspension est stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 15 min. Après stérilisation, la gélose liquéfiée est refroidie à 50°C dans un bain-marie. Un volume de 0,5 ml de la suspension de spores de *Bacillus subtilis* titrée à 10^{10} UFC/ml (Difco) est ajouté à 1 litre de gélose MH fondue. La gélose est coulée dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte et laissée refroidir à la température du laboratoire.

Quatre puits équidistants sont percés dans chaque gélose solidifiée et 20 µl de chaque dilution d'antibiotique ou du surnageant sont ajoutées à chaque puits dans les boîtes correspondantes.

Chaque concentration d'antibiotique libre sert à l'établissement de la courbe d'étalonnage et chaque solution recueillie à partir des liposomes est testée en triplicata.

Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C, pendant 16 à 18 h.

À la fin de la période d'incubation, les diamètres d'inhibition obtenus pour chaque concentration d'antibiotique sont mesurés et une courbe d'étalonnage des moyennes des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique est tracée.

On peut déduire la concentration d'antibiotique dans les liposomes ou dans le surnageant en rapportant sur la courbe d'étalonnage la moyenne des diamètres d'inhibition obtenus avec chaque solution d'antibiotique libérée des vésicules.

2.10 Sensibilité des Chlamydiae aux antibiotiques

2.10.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) des antibiotiques sous forme libre et sous forme liposomale

Pour chaque expérience, des feuillets confluents de 24 h de cellules HeLa 229 produits dans des plateaux de 24 puits avec ou sans lamelles ont été inoculés avec *C. trachomatis* à un titre de 10 000 UFI / puits. L'inoculum a été dilué dans du SPG. Après inoculation des feuillets cellulaires, les plateaux ont été centrifugés pendant 1 h à 2200 rpm. Durant la centrifugation les dilutions d'antibiotique sous forme libre ou liposomale (0,007 à 4,0 µg/ml) ont été effectuées dans du milieu de culture de Chlamydiae. Chaque dilution d'antibiotique a été testée en duplicata. À la fin de la centrifugation l'inoculum a été aspiré et 1,0 ml de chaque dilution d'antibiotique sous forme libre ou liposomale à des concentrations définies, a été ajouté dans les puits correspondants. Un volume de 1,0 ml de milieu de culture sans antibiotique a été ajouté dans les puits contrôles. Après le temps d'incubation requis, 48 h (LGV) ou 72 h (trachome), à 37 °C sous 5 % CO₂, pour la détermination de la CMI, les lamelles ont été colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa et les inclusions détectées au microscope au grossissement 400 X.

Pour la détermination de la CMB, les tapis infectés ont été décollés des puits sans lamelles par grattage, avec 0,5 ml de SPG. De nouveaux tapis cellulaires ont été infectés avec les suspensions obtenues par grattage. Après centrifugation des plateaux infectés pendant 1 h à 2 200 rpm, l'inoculum a été aspiré et 1,0 ml de milieu de culture de Chlamydia sans antibiotique a été ajouté dans chaque puits. Après 48 ou 72 h d'incubation les lamelles ont été colorées puis les inclusions recherchées au microscope. La CMI a été définie comme

étant la plus faible concentration d'antibiotique à laquelle aucune inclusion n'est observée.

La CMB a été définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui ne permet pas la formation d'inclusion après un second passage en milieu sans antibiotique.

Avec cette expérience il est possible de déterminer si la bactérie a été simplement inhibée par l'antibiotique ou si au contraire elle a été détruite.

2.10.2 Mise en évidence des inclusions chlamydiennes

2.10.2.1 Coloration des inclusions chlamydiennes par May-Grünwald-Giemsa

À la fin de l'incubation le milieu de culture est aspiré et le feuillet cellulaire rincé avec 0,01M de PBS pH 7,0. Les tapis infectés sont par la suite fixés pendant 10 min avec 1,0 ml de méthanol à 95%. Ensuite, le méthanol est aspiré et chaque puits est rincé avec 0,5 ml de colorant May-Grünwald préalablement filtré. Après rinçage les tapis infectés sont colorés avec 0,5 ml de colorant May-Grünwald pendant 5 min, puis le colorant est aspiré et les puits lavés 3 fois avec de l'eau du robinet. Après lavage, chacun des puits est rincé avec 0,5 ml de colorant Giemsa fraîchement filtré. Ensuite, on ajoute 1 ml de Giemsa par puits et on laisse colorer pendant 10 min. Après cette dernière coloration, le Giemsa est éliminé de chaque puits et ces derniers sont lavés 3 fois avec de l'eau du robinet.

Après coloration puis rinçage des lamelles dans l'acétone et dans du xylène, les lamelles sont montées sur lame avec une goutte de Permount, le côté inoculé de la lamelle retourné contre la lame.

Au terme de la coloration, les inclusions chlamydiennes intracytoplasmiques sont recherchées au microscope à un grossissement de 400X.

Les particules chlamydiennes maintenues dans l'inclusion intracytoplasmique se colorent en bleu foncé, le cytoplasme en bleu pâle, souvent réduit à une mince couche qui entoure le noyau et l'inclusion. Le noyau se colore en rouge-violet avec les nucléoles de couleur plus foncée.

2.11 Purification des corps élémentaires chlamydiens

Des feuilletts confluents de cellules HeLa 229 dans des flacons de 75cm² ont été préparés. Ils ont été inoculés avec suffisamment de corps chlamydiens pour obtenir $\geq 90\%$ des cellules infectées, et incubés 48 h pour les souches LGV et 72 h pour les souches de type trachoma à 37°C sous 5% de CO₂.

Après incubation, le milieu de culture a été éliminé et les feuilletts infectés sont grattés avec 10 ml de tampon SPG à l'aide d'un râteau stérile. Les suspensions obtenues sont bien homogénéisées et transférées dans des tubes stériles. Les suspensions chlamydiennes sont par la suite traitées aux ultrasons deux fois pendant 30 s pour faire éclater les cellules et libérer les corps chlamydiens des cellules. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 2000 rpm pendant 15 min dans une centrifugeuse RC2-b (rotor : SS34) Sorvall. Après centrifugation le surnageant est recueilli : il contient les corps chlamydiens et des traces de débris cellulaires contaminants. Le surnageant est par la suite centrifugé à 15000 rpm pendant 60 min pour sédimenter les corps chlamydiens. Le culot obtenu est repris dans du tampon SPG. Les corps élémentaires chlamydiens sont purifiés par une centrifugation à 45000 rpm pendant 30 min à travers une couche de diatrizoate de sodium à 35 % (p/v) dans une ultracentrifugeuse TL-100 (Beckmann Instruments, Palo Alto, Ca). La bande des corps élémentaires chlamydiens est recueillie à l'aide d'une pipette Pasteur

stérile et mise en suspension dans 3 volumes de tampon SPG. Les corps élémentaires sont centrifugés à 45000 rpm pendant 30 min à 4°C, ceci pour éliminer les traces de diatrizoate de sodium.

A la fin de la centrifugation, les culots obtenus sont resuspendus dans du tampon SPG. L'étape de centrifugation est répétée deux autres fois pour éliminer les traces résiduelles de diatrizoate. Les corps élémentaires purifiés sont remis dans du tampon SPG et sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.12 Extraction de l'ADN plasmidique

2.12.1 Technique d'isolation de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique a été isolé par la méthode de Birnboim et Doly (1979) avec quelques modifications. Le traitement avec lysozyme a été omis. Des corps élémentaires purifiés ont été centrifugés à 52000 rpm durant 30 min à 4°C afin de sédimenter les Chlamydiae. Le culot ainsi obtenu a été resuspendu dans 100 µl d'une solution contenant 25mM Tris HCl pH 8.0, 50mM de glucose, et 10mM d'EDTA pH 8.0. Après une incubation de 5 min à la température de la pièce, les cellules ont été lysées par l'addition de 200 µl d'une solution composée de 1% SDS et 0,2N NaOH. On mélange la solution par inversion des tubes plusieurs fois, ensuite on les incube à la température ambiante pendant 5 min. À la fin de l'incubation 150 µl d'une solution d'acétate de potassium à 5 M et d'acide acétique glacial a été ajouté. Les tubes ont été placés dans un bac de glace durant 5 min. On remarque la formation d'un précipité. Le matériel précipité a été séparé du reste de la solution par une centrifugation à vitesse maximale dans une microcentrifuge Eppendorf

de modèle 5415 (Brinkmann Instruments, Rexdale, Ont) pendant une minute. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été transféré dans un autre tube stérile. Un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamyl a été ajouté. Après agitation, la phase aqueuse est séparée par centrifugation à vitesse maximale (14000 rpm) dans une microcentrifuge pendant une minute. Le surnageant a été transféré dans un tube stérile. L'ADN plasmidique a été précipité par l'addition de 2 volumes d'éthanol 100% à la température du laboratoire pendant 2 min. Après une centrifugation à vitesse maximale pendant 5 min, l'éthanol a été éliminé et le culot d'ADN séché sur un papier buvard. Le culot d'ADN a été lavé avec 1 ml d'éthanol à 70%, et par la suite il a été centrifugé à vitesse maximale pendant 2 min. Le culot d'ADN plasmidique a été séché, puis resuspendu dans 30 µl de tampon TE (10mM Tris HCl pH 8 et 10mM EDTA 0,5 M) + Rnase (20µg/ml). Cet ADN sera par la suite analysé sur gel d'agarose.

2.12.2 Électrophorèse de l'ADN plasmidique sur gel d'agarose

Un volume de seize microlitres d'ADN plasmidique, a été préparé pour l'électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% selon la méthode décrite par Maniatis et coll. (1982). L'ADN plasmidique a été dilué dans un tampon composé de 0,25 M de bleu de bromophénol et 30% de glycérol. La migration s'est effectuée dans du tampon TAE contenant du bromure d'éthidium (1 mg/ml), à un voltage constant de 100 V pendant 4 h à un ampérage de 120 mA. Le plasmide a été visualisé à l'aide d'un transilluminateur UV (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ) et photographié à l'aide d'un appareil Polaroid DS-34 sur pellicule Polaroid-667 (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ).

2.12.3 Estimation des poids moléculaires des plasmides

Le poids moléculaire des plasmides a été estimé par comparaison de leurs caractéristiques migratoires avec celles de marqueurs plasmidiques superenroulés (ADN non digéré) (Gibco BRL) de poids moléculaires connus ou du marqueur d'ADN digéré de poids moléculaire II (Boehringer Mannheim Laval, Québec, Canada).

2.13 Analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens

2.13.1 Dosage des protéines chlamydiennes

2.13.1.1 Principe de la méthode

La concentration des protéines totales chlamydiennes a été déterminée en utilisant les réactifs de Bio-Rad (Protein Assay Kit II) par la méthode de Bradford. Cette méthode utilise comme protéine de référence l'albumine sérique bovine (ASB). Le principe consiste à mélanger une solution de protéine de concentration connue à un colorant acide. L'intensité de la couleur varie en fonction de la quantité de protéine en solution. L'absorbance de chaque concentration de protéine connue est mesurée et une courbe d'étalonnage de la concentration des protéines (ASB) en fonction de la densité optique est tracée. On peut alors déterminer la concentration d'un échantillon inconnu en mesurant son absorbance et en rapportant sa densité optique sur la courbe d'étalonnage.

2.13.1.2 Courbe d'étalonnage

La solution mère de la protéine de référence ASB a une concentration de 1,35 mg/ml. Elle a été diluée pour obtenir une concentration finale de 10.0 µg/ml. Cinq dilutions à partir de la solution de protéine à 10.0 µg/ml sont effectuées en duplicata dans de l'eau déionisée stérile (voir tableau VI). Des volumes de 800 µl de chaque dilution de la protéine ASB sont distribués dans des tubes stériles auxquels 200 µl de colorant concentré est ajouté. Après avoir homogénéisé, les tubes sont incubés pendant 5 min à la température de la pièce puis les densités optiques sont mesurées à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. À partir des moyennes des densités optiques obtenues, on trace la courbe d'étalonnage de la concentration de la protéine de référence (ASB) en fonction de la densité optique.

2.13.1.3 Dosage des protéines chlamydiennes totales par la microméthode

Les corps élémentaires chlamydiens purifiés ont été mis en ébullition pendant 1 min dans 0,1% de SDS. Des dilutions de protéines chlamydiennes ont été effectuées en duplicata dans des tubes stériles selon le tableau VII. Ce tableau indique respectivement le volume d'échantillon, d'eau, de colorant ajouté ainsi que le facteur de dilution obtenu. Ces tubes sont incubés à la température de la pièce pendant 5 min. Les densités optiques sont mesurées à une longueur d'onde de 595 nm. La moyenne des densités optiques de chaque échantillon est rapportée sur la courbe d'étalonnage et la quantité de protéines chlamydiennes est déduite.

Tableau VI

Préparation des dilutions de la protéine standard (ASB)

Volume (μL) de la solution mère d'ASB (10,0 $\mu\text{g/ml}$)	Eau déionisée (μl)	Concentration finale ($\mu\text{g/ml}$)
100	900	1,0
200	800	2,0
400	600	4,0
600	400	6,0
800	200	8,0
1000	0	10,0

ASB : albumine sérique bovine

Tableau VII

Préparations des dilutions des protéines chlamydiennes

Protéine chlamydienne (μl)	Eau déionisée (μl)	Colorant (μl)	Facteur de dilution
8,0	792,0	200,0	100,0
20,0	780,0	200,0	40,0
40,0	760,0	200,0	20,0
80,0	720,0	200,0	10,0

2.13.2 Analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens par SDS-PAGE

Les protéines chlamydiennes ont été séparées par migration sur gel de polyacrylamide à une concentration de 12,5%, en présence de SDS (Laemmli et Favre, 1970) en utilisant le système Mini-protean II electrophoresis cell de Bio-Rad.

Elles ont été solubilisées dans du tampon d'échantillon contenant 10% (p/v) SDS, 0,5 M de Tris HCl pH 6,8, 10% (v/v) de glycérol, 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol et 0,05% (v/v) de bleu de bromophénol puis portées à ébullition pendant 10 min. Un volume de 20µl du mélange protéine-tampon d'échantillon est par la suite déposé dans le puits correspondant sur le gel. L'électrophorèse s'effectue à un voltage constant de 200 V pendant 45 min ou jusqu'à ce que le tampon d'échantillon atteigne la base du gel.

2.13.3 Coloration et décoloration des gels

À la fin de l'électrophorèse, les protéines sont fixées avec une solution de méthanol/acide acétique glacial puis colorées par le Bleu de Coomassie pendant 4 h, à la température du laboratoire. Ensuite, les gels sont décolorés pendant 4 h avec une solution de décoloration contenant méthanol/eau (1v/1v) + 10% (v/v) d'acide acétique glacial.

Enfin, le gel des protéines est déposé dans un sachet en plastique scellé puis photographié.

2.13.4 Détermination des poids moléculaires des protéines

Les poids moléculaires des protéines sont déterminés par comparaison des profils protéiques avec ceux des protéines de poids moléculaire connu inclus dans chaque gel. Ces

protéines sont la phosphorylase b (97,4 kDa), l'albumine bovine (66,2 kDa), l'ovalbumine (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,6 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa) (Bio-Rad laboratoires, Richmond, Ca).

2.14 Établissement de l'infection persistante à *Chlamydia trachomatis*

Nous avons utilisé le modèle établi par Beatty et coll. (1993) avec quelques modifications pour notre étude sur la persistance chlamydienne in vitro. Ces auteurs ont utilisé le sérotype A de *C. trachomatis* pour le modèle qu'ils ont établi. Nous devons dans un premier temps déterminer les paramètres optimaux pour l'établissement de l'état de persistance chez Chlamydiae. Nous allons établir le modèle tout d'abord avec la souche de type A et une fois tous les paramètres optimaux établis, nous allons établir une infection persistante pour les deux autres sérotypes (sérotypes D et L2).

2.14.1 Détermination des paramètres optimaux pour l'établissement de l'infection persistante

2.14.1.1 Taille de l'inoculum

Dans le modèle de Beatty et coll. (1993), un inoculum chlamydien de 3×10^5 UFI/ml a été utilisé pour établir l'infection chlamydienne. Cet inoculum est assez important quand nous le comparons aux inoculas utilisés lors des études sur la sensibilité des Chlamydiae aux antibiotiques qui vont de 10^2 à 10^4 UFI/ml. Dans notre étude, un inoculum de 10^4 UFI/ml a été utilisé pour l'étude de la sensibilité des Chlamydiae aux antibiotiques.

Étant donné l'écart important entre les titres en question, nous avons décidé dans un premier temps de tester deux différents titres de l'inoculum pour l'établissement de l'infection persistance chlamydienne, soit 4×10^4 UFI/ml et 3×10^5 UFI/ml et de déterminer si des résultats comparables peuvent être obtenus avec ces deux titres. Dans l'éventualité où des résultats similaires seraient obtenus, il a été convenu que nous continuerions avec un inoculum de 4×10^4 UFI/ml pour standardiser le titre de l'inoculum dans ce travail.

2.14.1.2 Concentrations d'IFN- γ à tester

Beatty et coll. (1993) ont testé des concentrations d'IFN- γ allant de 0 à 2,0 ng/ml. Nous allons utiliser des concentrations d'IFN- γ allant de 0 à 50,0 ng/ml pour vérifier l'effet des concentrations élevées d'IFN- γ sur la croissance chlamydienne et le développement de l'état de persistance. Chacune des dilutions à tester a été préparée dans du milieu de culture des Chlamydiae (MEMH + 10% de sérum de veau fœtal + 0,5 μ g/ml du cycloheximide).

2.14.1.3 Traitement des feuillets cellulaires à infecter au préalable avec l'IFN- γ

Des protocoles plus récents sur l'étude de la persistance in vitro incluent un prétraitement des cellules à infecter avec l'IFN- γ 24 h avant l'infection (Perry et coll., 1999).

Nous avons décidé d'évaluer l'effet du prétraitement des cellules à l'IFN- γ ainsi que la durée du traitement avec l'IFN- γ sur le développement de la persistance chlamydienne.

Les feuillets cellulaires confluent ont été prétraités 24 h avant l'infection avec des doses croissantes d'IFN- γ (0 à 50,0 ng/ml).

Après infection des cellules avec *C. trachomatis*, l'inoculum chlamydien a été remplacé soit par du milieu de culture contenant les différentes dilutions d'IFN- γ à tester (0 à 50,0ng/ml) ou du milieu de culture sans IFN- γ . Avec cette dernière expérience nous avons voulu vérifier l'effet de la durée du traitement sur la croissance chlamydienne en effectuant un traitement de 96h ou de 24h avec l'IFN- γ .

2.14.1.4 Effet du cycloheximide sur le développement de la persistance induite par l'IFN- γ

Ce test a été effectué dans le but de déterminer si le développement de la persistance induit par l'IFN- γ est dépendant de la synthèse protéique de la cellule hôte.

Les cellules HeLa 229 infectées avec *C. trachomatis* ont été traitées en présence d'IFN- γ seul ou d'IFN- γ avec du cycloheximide.

Le cycloheximide est un inhibiteur de la synthèse protéique des cellules eucaryotes, il est toujours ajouté dans le milieu de culture des Chlamydiae. Son utilisation augmente la sensibilité des cellules aux Chlamydiae.

2.14.2 Détermination de la concentration optimale d'IFN- γ induisant la forme persistante.

Des feuillets cellulaires confluents produits dans des plateaux de 24 puits ont été préparés la veille de l'inoculation. Les feuillets ont été traités au préalable avec 1,0 ml de DEAE-dextran pendant 30 min à la température du laboratoire pour les plateaux à infecter avec les souches du biovar trachome.

À la fin de l'incubation, le DEAE-dextran a été aspiré et les puits de chaque plateau ont été inoculés avec chaque souche à tester avec le titre approprié (4×10^4 ou 3×10^5 UFI/ml). Les

plateaux ont été centrifugés à 2 200 rpm pendant 1 h à 30°C. Par la suite, l'inoculum a été aspiré et 1,0 ml de chacune des dilutions d'IFN- γ (0 à 50,0 ng/ml) a été ajouté dans les puits correspondants. Un volume de 1,0 ml de milieu de culture des Chlamydiae a été ajouté dans les puits contrôle.

Les plateaux ont été incubés à 37°C en présence de 5 % de CO₂ pendant 48 h pour les souches du biovar LGV ou pendant 72 h pour les souches du biovar trachome.

Au terme de l'incubation les lamelles ont été colorées par la coloration May-Grünwald-Giemsa, et les inclusions chlamydiennes intracytoplasmiques ont été recherchées au microscope à un grossissement de 400 fois.

Les inclusions ont été comptées pour chacune des dilutions et la concentration d'IFN- γ provoquant des changements dans la morphologie et dans le nombre des Chlamydiae est déterminée.

2.14.3 Sensibilité des souches persistantes aux antibiotiques

Le protocole utilisé pour la détermination de la sensibilité des Chlamydiae aux antibiotiques ressemble à celui décrit au paragraphe 2.14.2.

Tout d'abord, nous devons établir l'infection persistante à *C. trachomatis* par traitement des feuillets cellulaires infectés à l'IFN- γ . Après infection des feuillets cellulaires confluent produits sur plateaux de 24 puits par *C. trachomatis* et traitement des cellules infectées par la concentration d'IFN- γ appropriée, les tapis infectés ont été incubés à 37°C en présence de 5% de CO₂ pendant 72h. Après cette période d'incubation le milieu de culture contenant l'IFN- γ a été enlevé puis remplacé par du milieu de culture frais contenant chacune des dilutions d'antibiotique à tester sous forme libre ou sous forme liposomale (0 à 8,0 μ g/ml) et

incubés dans les mêmes conditions pendant 72h. Au terme de l'incubation les lamelles sont colorées par la coloration May-Grünwald-Giemsa, et les inclusions chlamydiennes recherchées au microscope à un grossissement de 400. Le dénombrement des inclusions à chacune des dilutions testées va permet d'évaluer l'inhibition de l'infectivité chlamydienne sous l'influence des différentes dilutions d'antibiotique.

2.14.4 Production des formes persistantes de *Chlamydia trachomatis*

Une fois la concentration d'IFN- γ induisant la formation des souches persistantes établie, des feuilletts cellulaires confluent sur plateaux de 24 puits sans lamelle sont infectés avec *C. trachomatis* à un titre de 40 000 UFI/ml puis incubés pendant 48 h (LGV) ou 72 h (trachome) avec la concentration d'IFN- γ retenue. Après incubation, le milieu de culture avec interféron est aspiré puis les tapis cellulaires infectés sont décollés par grattage avec 0,5 ml de SPG par puits. La suspension chlamydienne obtenue est par la suite purifiée pour obtenir des corps élémentaires purifiés. Les corps élémentaires purifiés sont mis en aliquots puis conservés à -70 °C jusqu'à leur utilisation et la concentration en protéines des corps élémentaires est déterminée.

2.14.5 Analyse des formes persistantes par SDS-PAGE

Les protéines chlamydiennes contenues dans du tampon d'échantillon ont été solubilisées par chauffage du mélange à 100 °C pendant 10 min. L'électrophorèse des protéines chlamydiennes est effectuée sur un gel à 12,5 % de polyacrylamide pendant 45 min ou jusqu'à ce que le tampon de l'échantillon ait atteint la base du gel.

Résultats

Tout d'abord , il nous apparaît important de caractériser chacun des trois sérotypes étudiés pour voir s'ils montrent des propriétés similaires avant d'établir l'état de persistance .

Chacun des trois sérotypes a été caractérisé par leur sensibilité aux antibiotiques libres et sous forme liposomale, leur profil d'ADN plasmidique, et leur profil des protéines de la membrane externe.

3.1. Taux d'encapsulation de la doxycycline à l'intérieur des liposomes

Nous avons été capables d'encapsuler la doxycycline à l'intérieur des liposomes par la méthode de sonication.

Le taux d'encapsulation de la doxycycline dans les liposomes de charge positive a été de 13,1%. L'activité de l'antibiotique encapsulé a été confirmée par des essais microbiologiques avec *Bacillus subtilis* comme organisme test.

3.2 Caractérisation des sérotypes de *C. trachomatis* étudiés

3.2.1 Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) des antibiotiques sous forme libre et sous forme liposomale.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique à laquelle aucune inclusion typique n'est observée à l'examen microscopique des lamelles colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa et observées au grossissement de 400.

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui ne permet pas la formation d'inclusions après un passage en milieu sans antibiotique.

Le tableau VIII, montre les valeurs des CMI et des CMB obtenues pour chacun des trois sérotypes testés.

Les CMI pour la doxycycline sont les mêmes pour chacun des trois sérotypes (0,6 µg/ml), tandis que les CMB varient entre 0,12 µg/ml (sérotypes A et D) et 1,0 µg/ml (sérotypes L2).

Les valeurs des CMI pour l'érythromycine sont à la même concentration pour chacun des trois sérotypes (0,6 µg/ml), leurs CMB se situent à une dilution supérieure, soit 0,12 µg/ml.

Pour chacun des antibiotiques testés la rifampicine présente les valeurs de CMI et de CMB les plus basses, 0,007 µg/ml et 0,015 µg/ml respectivement.

Le tableau IX, présente l'activité de la doxycycline sous forme libre et sous forme liposomale sur la croissance de *C. trachomatis*.

Les liposomes vides n'ont pas d'activité inhibitrice sur *C. trachomatis*. Les valeurs des CMI pour la doxycycline liposomale sont de 0,03 µg/ml pour chacun des sérotypes testés tandis que les valeurs des CMB sont de 0,06 µg/ml pour les souches A et D et de 0,5 µg/ml pour le sérotypes L2. On peut remarquer que la doxycycline sous forme liposomale possède une activité inhibitrice supérieure sur la croissance chlamydienne que sa forme libre (tableau IX et X).

Tableau VIII

Activités des différents antibiotiques sur la croissance de 3 sérotypes de *Chlamydia trachomatis*

Antibiotiques	Sérotipe A		Sérotipe D		Sérotipe L2	
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)
Doxycycline libre	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	1,00
Erythromycine	0,06	0,12	0,06	0,120	0,06	0,120
Rifampicine	0,007	0,015	0,015	0,015	0,007	0,007

Tableau IX

Activité de la doxycycline sous forme libre et liposomale sur la croissance de 3 sérotypes de *C. trachomatis*

Antibiotiques	Sérotipe A		Sérotipe D		Sérotipe L2	
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)
Doxycycline Libre	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	1,00
Doxycycline Liposomale	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,5

Tableau X

Nombre d'inclusions chlamydiennes détectées en présence des concentrations croissantes de doxycycline sous forme libre et liposomale après contact de 72 h avec l'antibiotique puis passage subséquent dans un milieu sans antibiotique (CMB)

Souche	Ab	Concentration de la doxycycline ($\mu\text{g/ml}$)									
		0	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1,0	2,0
A	Dox Libre	>330	>330	330	16	4	0	0	0	0	0
A	Dox Lip+	>202	>202	202	2	0	0	0	0	0	0
D	Dox Libre	>312	>312	312	18	5	0	0	0	0	0
D	Dox Lip+	>208	>208	208	3	0	0	0	0	0	0
L2	Dox Libre	> 2350	> 2350	> 2350	2350	400	216	100	8	0	0
L2	Dox Lip+	> 1680	> 1680	> 1680	1680	312	142	22	0	0	0

3.2.2 Analyse de l'ADN plasmidique de *C. trachomatis*

L'ADN plasmidique de *C. trachomatis* a été isolé par la méthode de la lyse alcaline à partir des corps élémentaires purifiés.

Nous avons été capables d'isoler des plasmides dans chacun des trois sérotypes analysés.

La figure 3, montre les profils obtenus après analyse des plasmides sur gel d'agarose.

Les puits 1, 2 et 3, montrent les profils de l'ADN plasmidique non digéré des trois sérotypes testés. Trois bandes plasmidiques sont observées pour chacun des sérotypes, migrant à peu près au même niveau et ayant des profils très semblables.

Dans cette même figure, les puits 4, 5 et 6 et les puits 7, 8 et 9 montrent les profils obtenus après digestion de l'ADN plasmidique avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI respectivement. La comparaison de ces profils, montre aussi des profils de restriction similaires. La digestion avec EcoRI a produit deux fragments différents tandis que la digestion avec BamHI a produit un seul fragment.

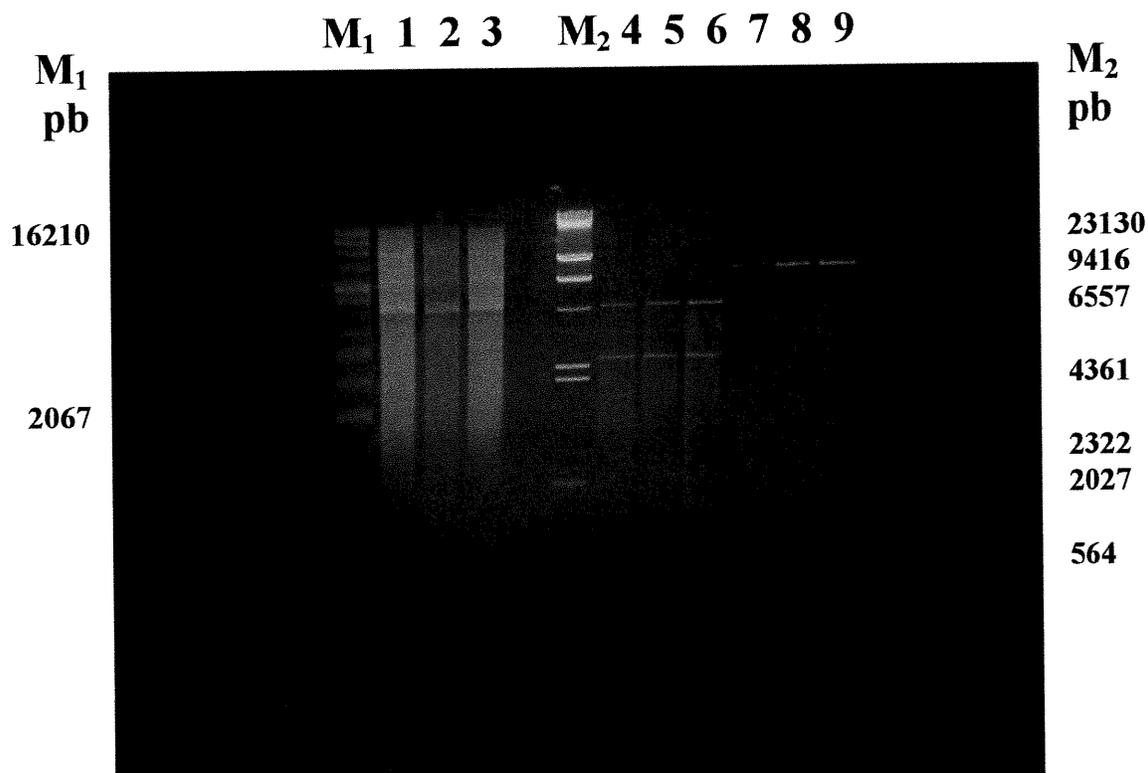


Figure 3 : Profils plasmidiques sur gel d'agarose 0,7% de chacun de sérotypes de *C. trachomatis* étudiés, isolés par la méthode de la lyse alcaline. M_1 : marqueur d'ADN superenroulé non digéré (Gibco BRL).

ADN plasmidique non digéré de : 1 : *C. trachomatis* sérotype A,

2 : *C. trachomatis* sérotype D, 3 : *C. trachomatis* sérotype L2.

M_2 : marqueur d'ADN digéré de poids moléculaire II (Boehringer Mannheim). ADN plasmidique digéré avec l'enzyme EcoRI de :

4 : *C. trachomatis* sérotype A, 5 : *C. trachomatis* sérotype D,

6 : *C. trachomatis* sérotype L2. ADN plasmidique digéré avec l'enzyme

BamHI de : 7 : *C. trachomatis* sérotype A, 8 : *C. trachomatis* sérotype D,

9 : *C. trachomatis* sérotype L2.

3.2.3 Analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens

L'analyse des protéines totales des corps élémentaires chlamydiens sur gel de polyacrylamide à 12,5% en présence de SDS a été effectuée après solubilisation des corps élémentaires purifiés dans un tampon d'échantillon contenant du SDS, du tris HCl, du glycérol, du β -mercaptoéthanol et du bleu de bromophenol, puis portés à ébullition pendant 10 min.

L'analyse du gel de l'électrophorèse après coloration au Bleu de Coomassie, nous permet de voir que les Chlamydiae possèdent un grand nombre de protéines mais qu'un petit nombre de celles-ci comptent pour la majorité de la masse protéique totale (figure 4). Chacun des trois sérotypes possède deux protéines principales, la MOMP avec un poids moléculaire qui varie entre 38 et 43 kDa selon les sérotypes et une protéine de 60kDa qui est moins apparente pour les sérotypes du biovar LGV.

On distingue chez chacun des sérotypes des protéines mineures avec des poids moléculaires d'environ 98,0 kDa, 40,0 kDa et 20 kDa.

Malgré qu'on ait ajusté la concentration en protéines à la même concentration pour chacun des trois sérotypes, les profils protéiques obtenus pour le sérotype L2 paraissent moins denses.

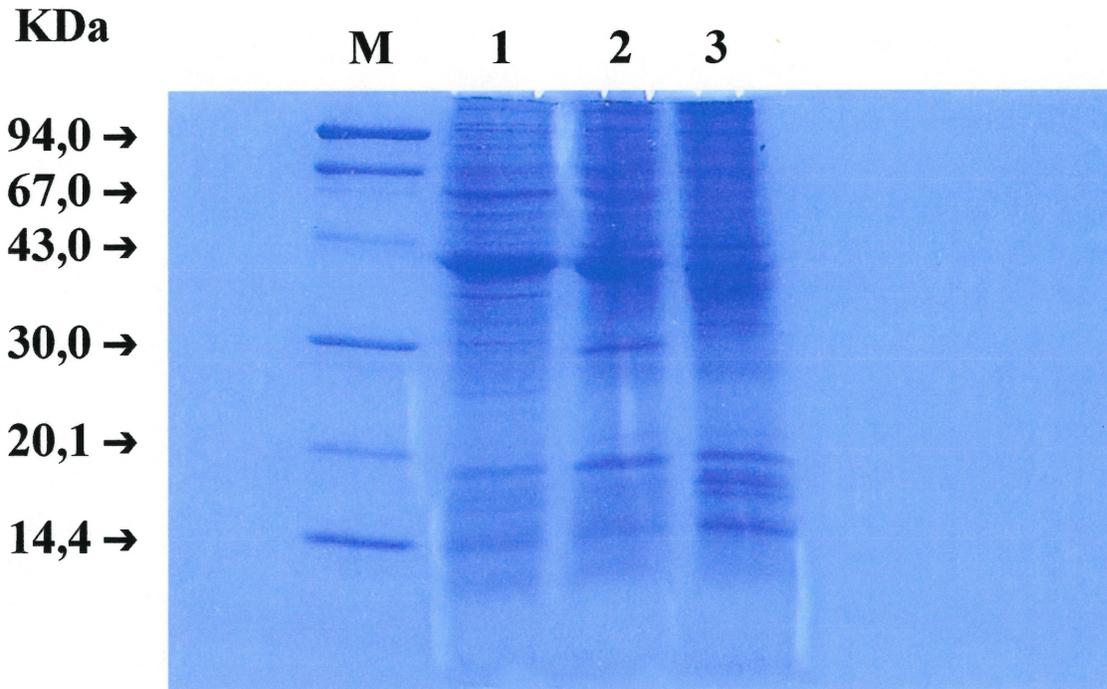


Figure 4 : Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des protéines totales chlamydiennes de chacune des souches étudiées. M : marqueur de poids moléculaire de haut en bas : phosphorylase b (94kDa), albumine sérique bovine (67kDa), ovalbumine (43kDa), anhydrase carbonique (30kDa), inhibiteur de trypsine (20,1 kDa) et α -lactalbumine (14,4 kDa),

1 : *C. trachomatis* sérotype A, 2 : *C. trachomatis* sérotype D, 3 : *C. trachomatis* sérotype L2

3.3 Établissement de l'infection persistante par traitement à l'IFN- γ .

Afin d'étudier l'activité des antibiotiques sur l'infection persistante à *C. trachomatis*, nous devons au préalable, induire chacun des trois sérotypes sous une forme persistante.

Nous avons suivi le modèle établi par Beatty et coll, (1993) avec modifications, pour l'étude de la persistance in vitro.

Nous devons dans un premier temps trouver la concentration d'IFN- γ nécessaire pour induire les changements de morphologie caractéristiques des formes persistantes, soit des inclusions intracytoplasmiques contenant des corps réticulés de forme élargie et absence des corps élémentaires infectieux (Beatty et coll., 1994).

La souche de *C. trachomatis* sérotype A, appartenant au biovar trachoma est la souche modèle que Beatty et coll., ont utilisé pour l'étude de la persistance. Dans une première étape la concentration d'IFN- γ nécessaire pour rendre ce sérotype persistant a été déterminée, dans une deuxième étape, la persistance des sérotypes D et L2 de *C. trachomatis* a été induite.

Nous avons cultivé *C. trachomatis* sérotype A avec des doses croissantes d'IFN- γ (0,1 ng/ml à 50,0 ng/ml) et la morphologie des inclusions analysées par microscope optique à un grossissement de 400 après coloration des inclusions intracytoplasmiques au colorant MG-Giemsa a été examinée.

Nous avons défini une inclusion chlamydienne comme typique, quand il y a présence de nombreux corps élémentaires, quelques corps réticulés en cours de division et des formes intermédiaires. La taille de la vacuole peut varier d'une inclusion à une autre.

Une inclusion de type persistante est plus petite que celle des inclusions de forme typique,

contenant des corps réticulés non différenciés de forme élargie et absence des corps élémentaires infectieux.

Le tableau XI, présente les taux d'inhibition obtenus après traitement des cellules infectées par *C. trachomatis* sérotype A avec des doses d'IFN- γ allant de 0,1 ng/ml à 2,0 ng/ml. On peut voir dans ce tableau que malgré la diminution du nombre et de la taille d'inclusions chlamydiennes, on n'observe pas d'inhibition significative de la croissance bactérienne. À toutes les concentrations testées on peut encore voir la présence d'inclusions bactériennes de forme typique. Nous avons dans un deuxième temps, augmenté la concentration d'IFN- γ jusqu'à une concentration finale de 50 ng/ml. On peut observer dans le tableau XII, qu'il faut utiliser des doses élevées d'IFN- γ (50,0 ng/ml) pour obtenir presque une inhibition complète de la croissance chlamydienne. Par contre, par l'analyse des inclusions au microscope optique on peut voir la présence des inclusions typiques même à des concentrations de 30 ng/ml. À aucune des concentrations testées on ne peut voir la morphologie des formes chlamydiennes persistantes.

On a par la suite dilué l'inoculum chlamydien à une concentration de 40 000 UFI/ml. On peut voir dans le tableau XIII, que malgré la diminution de l'inoculum chlamydien d'environ 10 fois et de l'utilisation des doses croissantes d'IFN- γ , on observe toujours la présence d'inclusions typiques et ce, même à une concentration de 50,0 ng/ml sans pour autant voir l'apparition des souches persistantes. Le traitement des cellules infectées avec une concentration d'IFN- γ de 50,0 ng/ml provoque une inhibition presque complète de la croissance chlamydienne mais aussi des cellules hôtes non infectées.

Tableau XI

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 3×10^5 UFI/ml

Concentration d'IFN- γ (η g/ml)	Nombre d'inclusions par champ(40X)	Taux d'inhibition
0	110,0	0%
0,1	94,0	14,5%
0,2	89,2	18,9%
0,5	87,6	20,4%
1,0	80,5	26,8%
2,0	79,2	28,0%

Tableau XII

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 3×10^5 UFI/ml

Concentration d'IFN- γ (η g/ml)	Nombre d'inclusions par champ(40X)	Taux d'inhibition
0	110,0	0%
4,0	77,4	29,6%
8,0	76,5	30,5%
16,0	75,5	31,4%
30,0	52,0	52,7%
50,0	9,1	91,7%

Tableau XIII

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 4×10^4 UFI/ml

Concentration d'IFN- γ (η g/ml)	Nombre d'inclusions par champ(40X)	Taux d'inhibition
0	40,2	0%
0,1	27,4	31,8%
0,2	28,0	30,3%
1,0	30,3	24,8%
2,0	25,0	37,8%
8,0	24,4	39,3%
16,0	24,0	40,3%
30,0	13,3	67,0%
50,0	1,5	96,0%

Nous avons essayé de voir l'effet du prétraitement des cellules à l'IFN- γ sur la croissance bactérienne.

Le tableau XIV, nous montre l'effet du prétraitement des feuillettes cellulaires à l'IFN- γ et l'effet de la durée du traitement sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A.

On observe à toutes les dilutions d'IFN- γ testés, la présence des formes typiques et pas d'inclusions caractéristiques des formes persistantes. On observe aussi que ni un prétraitement des cellules avant l'infection avec l'IFN- γ ni un traitement plus long avec l'IFN- γ ont réussi à induire le sérotype A à l'état persistant. On remarque quand même, qu'à un traitement de 96h avec une concentration d'IFN- γ de 50 ng/ml, a un effet marqué sur la croissance chlamydienne avec la plupart des inclusions restantes apparaissant vides et de taille très petite et une inhibition très importante du nombre des cellules hôtes.

Nous voulions par la suite savoir si la présence du cycloheximide dans le milieu de croissance a un effet sur l'IFN- γ .

Pour cela, nous avons infecté les cellules HeLa 229 avec *C. trachomatis* en présence des doses croissantes d'IFN- γ seul ou d'IFN- γ avec cycloheximide.

On peut voir dans le tableau XV, un effet inhibiteur de l'IFN- γ sur la croissance chlamydienne plus important en absence de cycloheximide qu'en la présence de ce dernier.

On peut constater que pour une concentration d'IFN- γ de 2,0 ng/ml il y a 84% d'inhibition en absence de cycloheximide par rapport à 33% d'inhibition en présence de cycloheximide à la même concentration d'IFN- γ .

L'analyse au microscope optique des cellules infectées traitées avec des concentrations d'IFN- γ entre 0,2 et 0,5 ng/ml montre la présence des formes chlamydiennes aberrantes de forme atypique caractéristiques des formes persistantes. Ces inclusions ne contiennent pas

des formes chlamydiennes typiques mais plutôt des inclusions avec des CR élargis caractéristiques des formes persistantes et absence des CE infectieux.

Tableau XIV

Effet du prétraitement des feuillets cellulaires à l'IFN- γ et de la durée du traitement sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 4×10^4 UFI/ml

Concentration d'IFN- γ (ng/ml)	Nombre moyen d'inclusions et taux d'inhibition	
	MEMH – IFN- γ (24h de traitement avec IFN- γ)	MEMH + IFN- γ (96h de traitement avec IFN- γ)
0	74,2 (0%)	61,0 (0%)
0,1	58,3 (21,4%)	43,4 (29,0%)
0,5	53,9 (27,0%)	43,6 (29,0%)
2,0	46,5 (37,0%)	40,0 (34,5%)
8,0	45,3 (39,0%)	35,7 (43,0%)
16,0	49,1 (34,0%)	22,5 (64,0%)
50,0	14,25 (81,0%)	Aucune inclusion typique visible

Tableau XV

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 4×10^4 UFI/ml en présence ou en absence du cycloheximide

Concentration IFN- γ (η g/ml)	Nombre moyen d'inclusions par champ (40X)			
	Cycloheximide +	Taux d'inhibition	Cycloheximide -	Taux d'inhibition
0	65,4	-	65,4	-
0,1	50,0	23,5%	41,6	36,5%
0,2	49,2	24,8%	38,7	41,0%
0,5	51,3	21,6%	23,7	64,0%
1,0	49,0	25,1%	20,6	68,5%
2,0	44,0	33,0%	10,4	84,0%

On peut voir aussi dans le tableau XV, qu'une concentration plus faible d'IFN- γ suffit pour induire une inhibition complète de la croissance chlamydienne en absence de cycloheximide.

Nous avons augmenté l'inoculum chlamydien à un titre de 300 000 UFI/ml pour voir si nos résultats allaient être reproductibles et aussi pour utiliser le même titre chlamydien que celui du modèle Beatty et coll., (1993). On observe encore une fois (tableau XVI), l'effet inhibiteur plus marqué de l'IFN- γ sur la croissance bactérienne en absence du cycloheximide qu'en sa présence.

La même expérience a été refaite et des valeurs comparables (tableau XVII) ont été obtenues.

Une fois que nous avons trouvé la concentration d'IFN- γ induisant l'infection persistante chez *C. trachomatis* sérotype A (0,2 à 0,5 ng/ml), nous avons voulu savoir si l'IFN- γ pouvait induire l'état de persistance chez les deux autres sérotypes étudiés dans notre projet, soit les sérotypes D et L2 de *C. trachomatis*.

Pour cela nous avons traité des cellules infectées pour chacun des trois sérotypes analysés avec des concentrations croissantes d'IFN- γ et en absence de cycloheximide et observé l'effet de cette cytokine sur la croissance bactérienne. Nous pouvons voir dans le tableau XVIII, un effet inhibiteur de l'IFN- γ plus important pour le sérotype A que pour les sérotypes D et L2. En effet une concentration de 8,0 ng/ml d'IFN- γ provoque un pourcentage d'inhibition d'environ 92,0% chez le sérotype A contre 32,0 et 21,0% pour les sérotypes D et L2 respectivement. On peut aussi voir par l'analyse des inclusions au microscope optique qu'un intervalle de 0,2 à 0,5 ng/ml d'IFN- γ provoque les changements morphologiques caractéristiques des souches persistantes chez le sérotype A mais n'a

aucun effet sur la morphologie des sérotypes D et L2. À aucune des concentrations d'IFN- γ utilisées on n'observe l'apparition des formes persistantes chez les sérotypes chlamydiens D et L2.

Tableau XVI

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 3×10^5 UFI/ml en présence ou en absence du cycloheximide

Concentration IFN- γ (η g/ml)	Nombre moyen d'inclusions par champ (40X)			
	Cycloheximide +	Taux d'inhibition	Cycloheximide -	Taux d'inhibition
0	111,0	0%	111,0	0%
0,1	90,0	18,9%	82,0	26,0%
0,2	88,6	20,2%	77,5	30,0%
0,5	85,2	23,2%	33,0	70,3%
1,0	80,2	27,7%	32,5	71,0%
2,0	78,5	29,3%	28,5	74,3%

Tableau XVII

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype A à un titre de 3×10^5 UFI/ml

Concentration de l'IFN- γ (η g/ml)	Nombre moyen d'inclusions par champ (40X)	Taux d'inhibition
0	107,0	0%
0,1	75,0	25,2%
0,2	71,6	33,0%
0,5	31,2	71,0%
1,0	26,5	75,2%
2,0	25,3	76,4%
4,0	20,0	81,3%
8,0	8,8	91,8%

Tableau XVIII

Effet de l'IFN- γ sur la croissance de 3 sérotypes de *Chlamydia trachomatis* cultivées sur cellules HeLa 229 dans un milieu de croissance sans cycloheximide à un titre de 4×10^4 IFU/ml

Concentration IFN- γ (ng/ml)	Nombre d'inclusions chlamydiennes après infection (UFI/ml) et pourcentage d'inhibition (%) Sérotype		
	A	D	L2
0	76 077 (0%)	66 123 (0%)	118 737 (0%)
0,2	50 879 (33%)	58 444 (12%)	104 517 (12%)
0,5	23 108 (70%)	57 795 (13%)	103 806 (13%)
2,0	18 842 (75%)	49 770 (25%)	103 095 (13%)
4,0	17 953 (77%)	48 348 (27%)	102 384 (14%)
8,0	6 257 (92%)	44 793 (32%)	93 852 (21%)
16,0	ND	44 082 (33%)	90 297 (24%)
32,0	ND	39 816 (40%)	88 164 (26%)
50,0	ND	36 972 (44%)	83 187 (30%)

3.4 Analyse des protéines totales du sérotype A induit persistant par traitement à l'IFN- γ

Nous avons analysé le profil protéique de la souche chlamydienne de sérotype A induite de façon persistante par le traitement à l'IFN- γ pour nous assurer qu'il présentait les caractéristiques propres des souches persistantes.

On peut voir dans la figure 5, une comparaison entre *C. trachomatis* sérotype A traité ou non avec une concentration de 0,2 ng/ml d'IFN- γ . La bande de la protéine MOMP (40kDa) et de la protéine de la membrane externe de 60 kDa chez le sérotype A traité à l'IFN- γ apparaissent moins denses que celles du sérotype A non traité, cette observation suggère que ce sérotype serait sous sa forme persistante.

3.5 Activité de la doxycycline encapsulée sur les formes persistantes de *C. trachomatis*

Nous avons effectué le test de sensibilité aux antibiotiques pour la souche chlamydienne de sérotype A dont la persistance a été induite par traitement avec 0,2 ng/ml d'IFN- γ .

Les concentrations de la doxycycline libre et de la doxycycline sous forme liposomale que nous avons utilisé étaient comprises entre 0 et 8,0 μ g/ml.

Le tableau XIX, montre que même à des concentrations de 8,0 μ g/ml de doxycycline sous forme libre et sous forme liposomale on peut encore voir la présence d'inclusions chlamydiennes. On remarque aussi que les formulations liposomales de la doxycycline exercent une activité antichlamydienne supérieure à celle de la doxycycline sous forme libre. En effet, même s'il reste encore des inclusions à des concentrations élevées de doxycycline liposomale, elles sont en nombre plus réduit en comparaison à celles qu'on trouve en présence de doxycycline sous forme libre. À la concentration la plus élevée

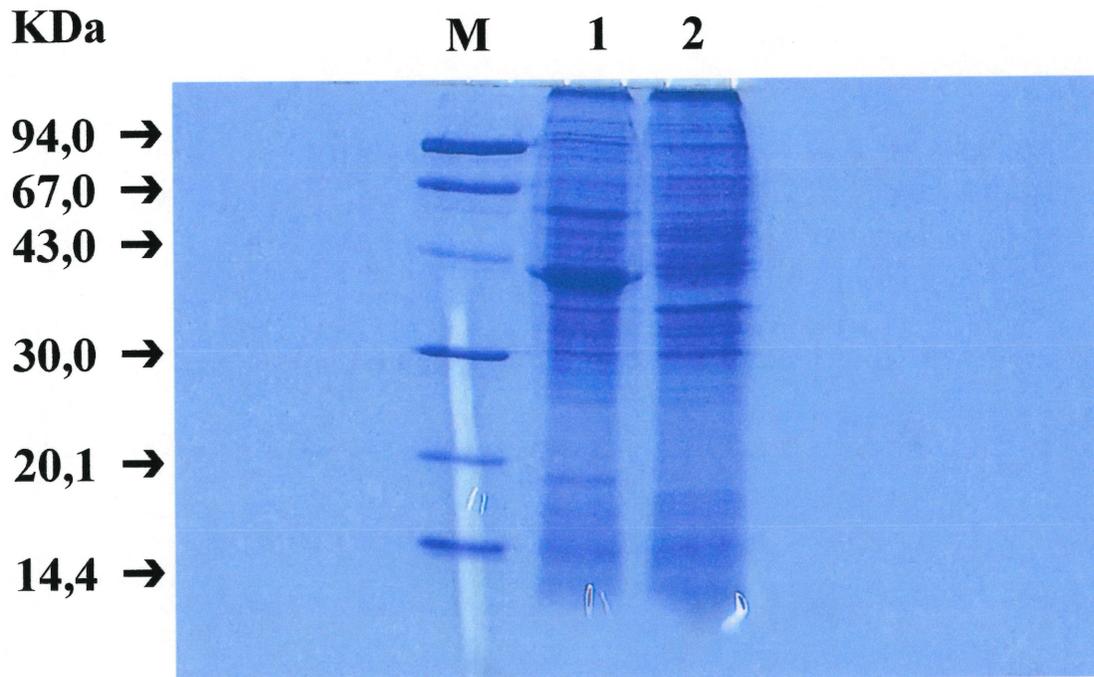


Figure 5 : Profils des protéines totales chlamydiennes obtenues après solubilisation des corps élémentaires purifiés intacts de *C. trachomatis* sérotype A dans du SDS lors d'une infection aiguë et lors d'une infection persistante respectivement. M : marqueur de poids moléculaire de haut en bas : phosphorylase b (94 kDa), albumine sérique bovine (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30kDa), inhibiteur de trypsine (20,1 kDa) et α -lactalbumine (14,4 kDa), 1 : une infection aiguë 2 : une infection persistante

d'antibiotique testé, soit 8,0 $\mu\text{g/ml}$, la doxycycline liposomale exerce une activité inhibitrice 10 fois supérieure à celle de la doxycycline libre (tableau XIX).

Tableau XIX

Nombre d'inclusions chlamydiennes persistantes détectées en présence de la doxycycline sous forme libre et liposomale (Inclusions/lamelle)

Concentration de la doxycycline ($\mu\text{g/ml}$)										
	0,0	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Dox libre	14931	>67	67	61	55	45	44	35	18	10
Dox lip+	14931	>72	72	61	16	13	4	2	2	1

3.6 Étude morphologique des cellules et des Chlamydiae au microscope optique

La coloration au May-Grünwald-Giemsa a été utilisée pour la détection des inclusions chlamydiennes.

La figure 6, présente un tapis confluent des cellules HeLa 229 photographié à l'état frais, en forme des cellules épithéliales.

La figure 8, nous montre des cellules HeLa non infectées après 72 h d'incubation, colorées au May-Grünwald Giemsa. Les cellules HeLa 229, prennent une forme plus ou moins ovales. Après coloration des cellules par le May-Grünwald-Giemsa, le noyau des cellules se colore en violet et les nucléoles en violet foncé. Le cytoplasme des cellules apparaît en bleu pâle.

On peut voir dans la figure 7, des cellules HeLa infectées avec *C. trachomatis* sérovar L2, 48h après infection et photographiées à l'état frais. Les cellules infectées ont perdu leur forme allongée et elles deviennent plus ou moins arrondies.

Les figures 12 et 13, montrent des cellules HeLa 229 infectées avec *C. trachomatis* L2, 48 h après l'infection et colorées au May-Grünwald Giemsa. Chacune des figures montre, des inclusions chlamydiennes de forme typique de différentes tailles. On remarque que le noyau cellulaire a été repoussé en périphérie et que le cytoplasme a été réduit à une simple bande périphérique. À ce stade de l'infection, la population chlamydienne est formée en grande partie de CE, de quelques CR et de formes intermédiaires. Les CR sont des particules de forme et de taille variables (0,5 à 1,3 μ m), les CE sont de forme sphérique et ont une taille plus petite que celle des CR. La taille des CE est d'environ 0,2 à 0,4 μ m.

La figure 14 et 15 montrent respectivement une inclusion caractéristique des souches persistantes 72 h après l'infection à deux grossissements différents. Une forme

chlamydienne atypique, montre le développement élargi et aberrant d'un CR non différencié, on observe aussi l'absence totale des CE infectieux.

La figure 11, montre l'effet de la doxycycline à une concentration sous-inhibitrice de 0,015 $\mu\text{g/ml}$, soit deux dilutions inférieures à la CMI. Après contact de 72 h avec la doxycycline, des formes chlamydiennes typiques disparaissent et sont remplacées par des inclusions de taille petite ne contenant que des CR avec une paroi souvent ballonnée et de rares CE.

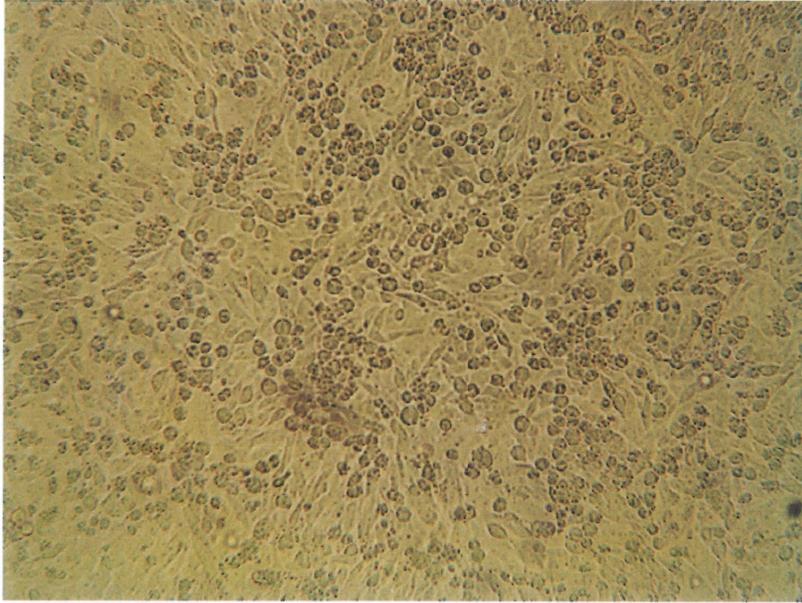


Figure 6 : Cellules Hela 229 non infectées à l'état frais à un grossissement de 40X

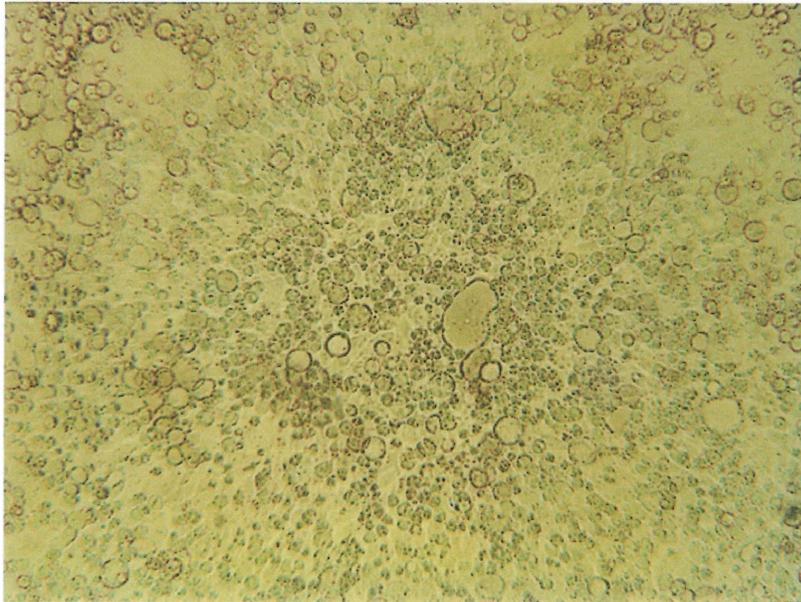


Figure 7 : Cellules Hela 229 infectées avec *C. trachomatis* sérotype L2, 48 h après l'infection à l'état frais à un grossissement de 40X

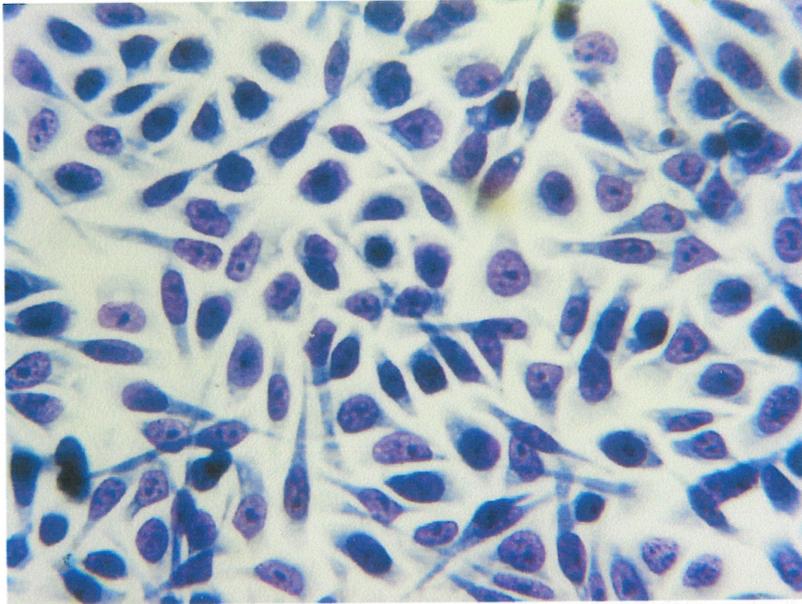


Figure 8 : Cellules Hela 229 non infectées après coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400x

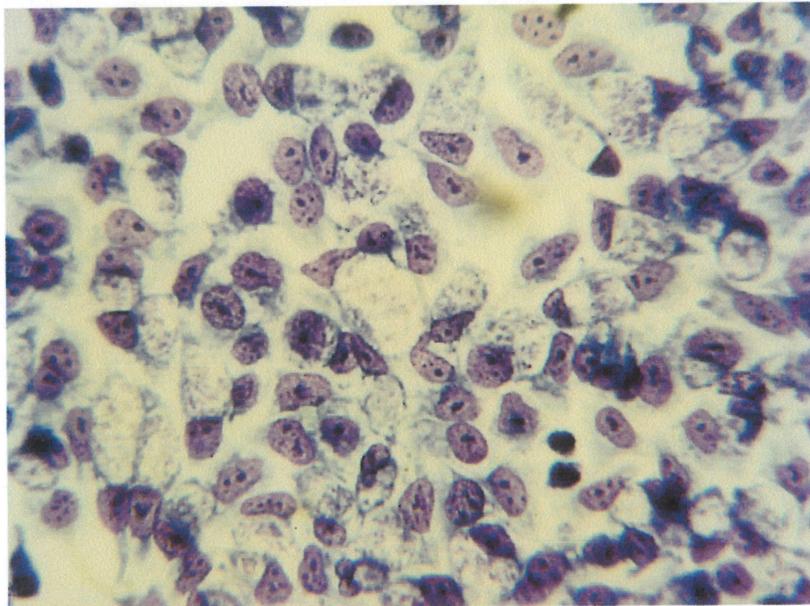


Figure 9 : Cellules Hela 229 infectées par *C. trachomatis* sérotype L2, 48 h après l'infection puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400x

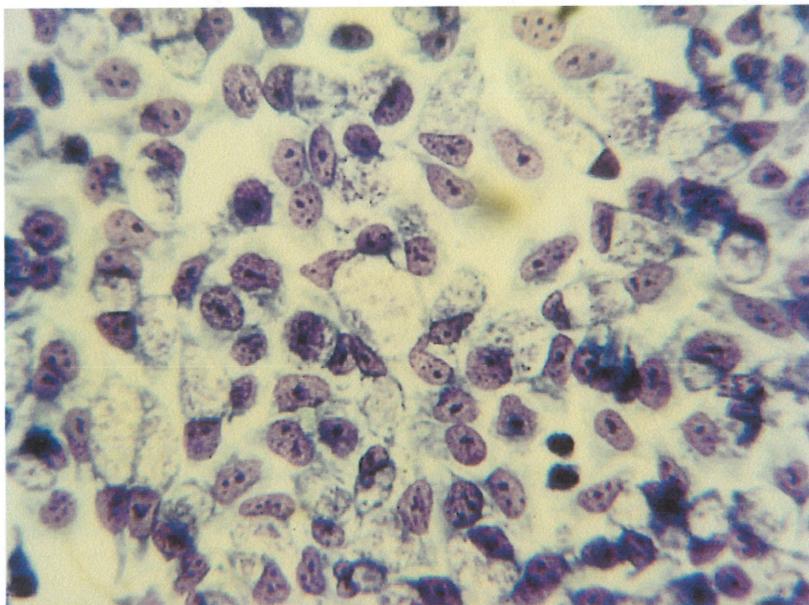


Figure 10 : Cellules Hela 229 infectées par *C. trachomatis* sérotype L2, 48 h après l'infection puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400x

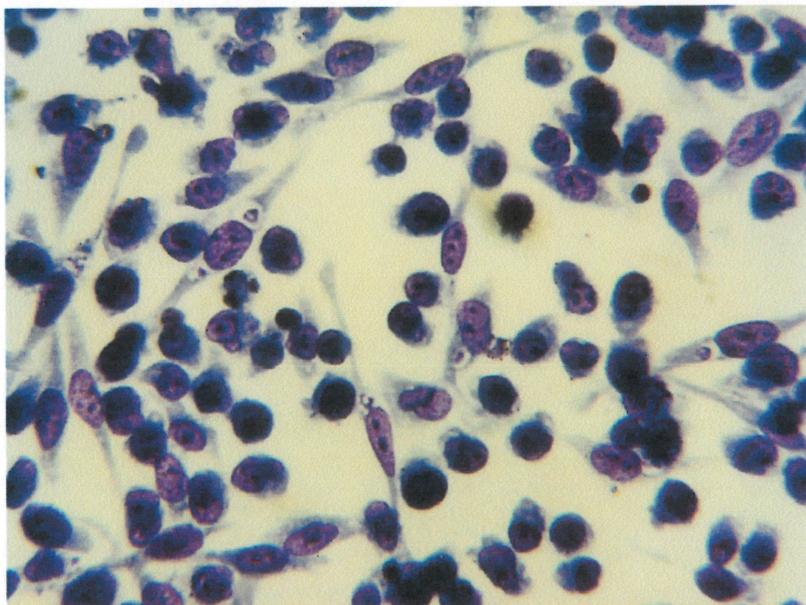


Figure 11 : Effet de la doxycycline sur la croissance de *C. trachomatis* sérotype L2 sur cellules Hela 229, après 48 h de contact avec une concentration d'antibiotique de 0,015 µg/ml, puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400x

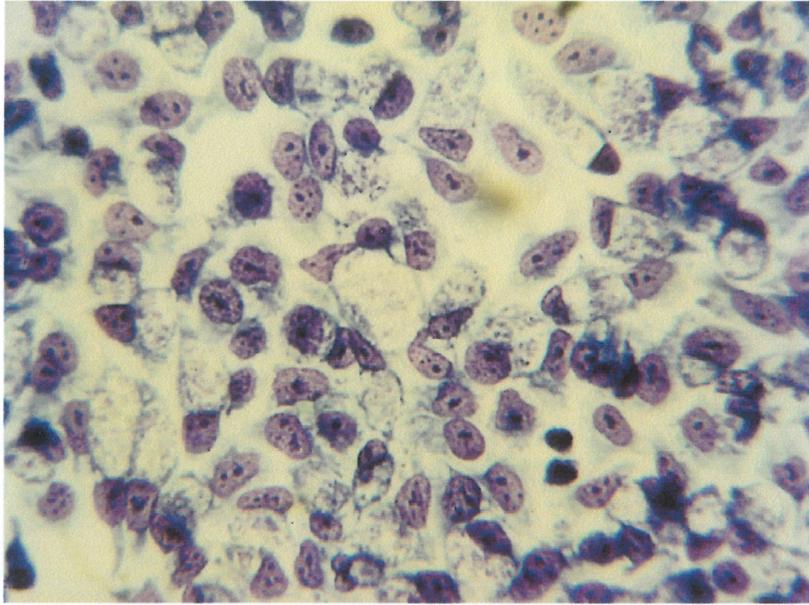


Figure 12 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection aiguë, 48 h après l'infection puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400x

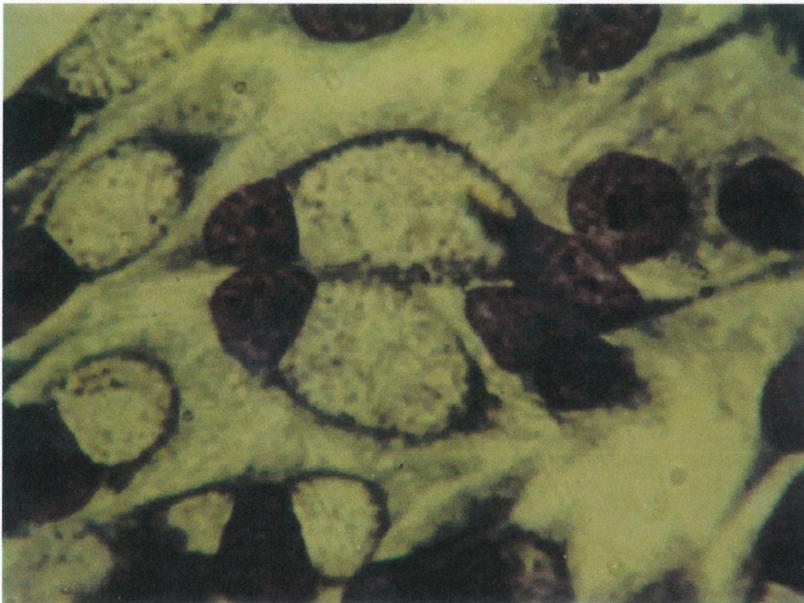


Figure 13 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection aiguë, 48 h après l'infection puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 1000x

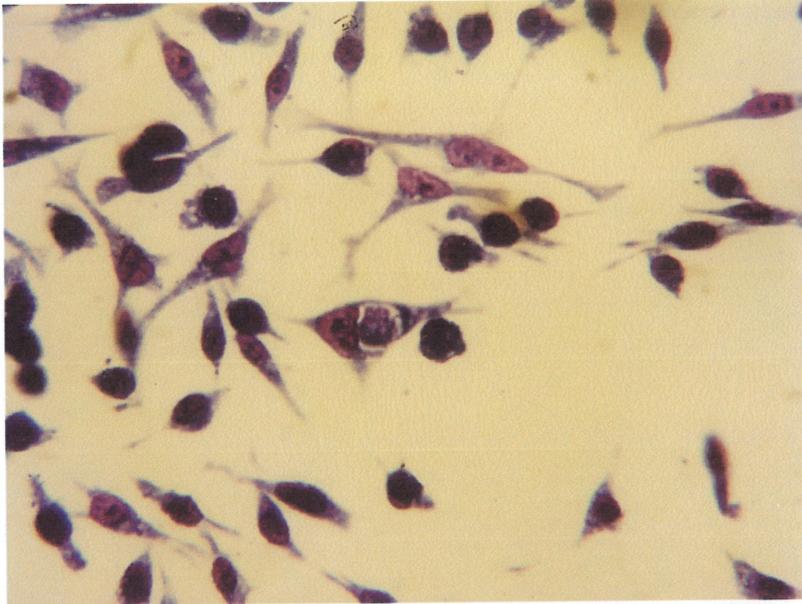


Figure 14 : Inclusions chlamydiennes caractéristiques d'une infection persistante, après traitement de *C. trachomatis* sérotype A avec 0,2 ng/ml d'IFN- γ puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 400x

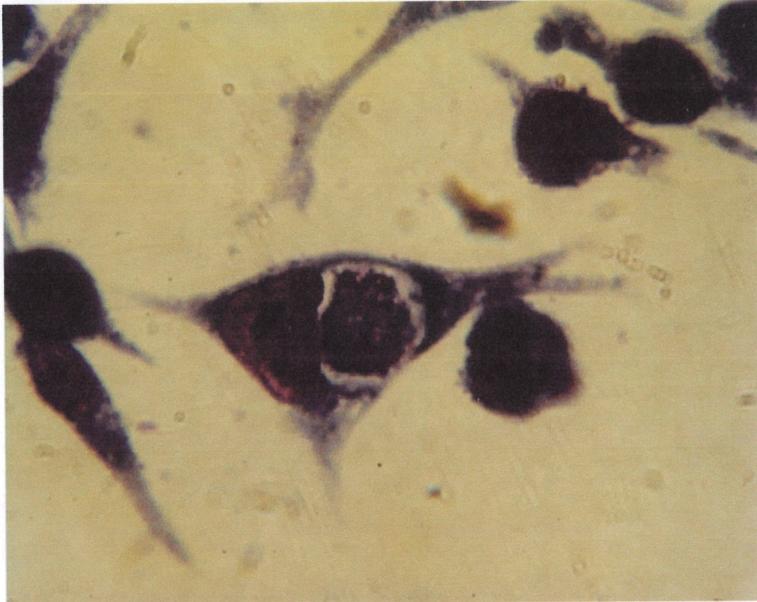


Figure 15 : Inclusion chlamydienne caractéristique d'une infection persistante, après traitement de *C. trachomatis* sérotype A avec 0,2 ng/ml d'IFN- γ puis coloration au May-Grünwald Giemsa à un grossissement de 1000x

Discussion

Les infections chlamydiennes constituent un problème de santé publique, en effet 50 à 70% des infections chez la femme sont asymptomatiques. L'existence d'infections chroniques malgré un traitement d'antibiotique adapté et bien suivi, laisse supposer la persistance des particules intracellulaires à l'état latent inaccessibles aux antibiotiques. Il existe de multiples évidences, comme par exemple, dans le cas du trachome (Ward et coll., 1990), que chacune des quatre espèces chlamydiennes est capable de provoquer des infections persistantes pendant des mois et même des années en absence de traitement. Jusqu'à maintenant tous les travaux faits sur l'étude de la persistance utilisent la souche chlamydienne de sérotype A appartenant au biovar trachome comme organisme test. Comme on l'a dit auparavant, il existe une multitude d'évidence qui laisse penser à l'existence d'un état de persistance lors de l'infection par chacune des 4 espèces chlamydiennes. In vitro, des facteurs induisant la persistance ont pu être identifiés. Il s'agit d'antibiotiques (pénicilline), de facteurs d'ordre nutritionnel (IFN- γ) et immunitaire. Nous voulons savoir si toutes les souches de *C. trachomatis* peuvent être induites dans un état de persistance en utilisant l'IFN- γ comme facteur induisant l'état de persistance.

Nous avons trois buts dans la présente étude. Premièrement, nous voulions caractériser chacun des trois sérotypes étudiés pour savoir si chacun d'eux avait des profils similaires au point de vue de leurs protéines de la membrane externe, leur contenu en ADN plasmidique et de leur sensibilité aux antibiotiques testés. Le deuxième but était de développer un modèle in vitro de la persistance chlamydienne. Nos études préliminaires ont été effectuées avec la souche chlamydienne de sérotype A, afin d'établir les paramètres optimaux pour notre modèle de persistance et de pouvoir par la suite les appliquer aux deux autres sérotypes chlamydiens étudiés (sérotype D et L2).

Notre troisième but était de déterminer la sensibilité des sérotypes induits persistants avec d'antibiotiques sous forme libre et sous forme liposomale.

Dans cette étude, nous avons dans un premier temps caractérisé trois sérotypes de *C. trachomatis* ayant des pouvoirs pathogènes différents. Le sérotype A provoquant le trachome, le sérotype D responsable des infections oculaires et génitales et le sérotype L2 responsable de la lymphogranulomatose humaine. La caractérisation a été effectuée par l'analyse de leurs profils protéiques, par l'analyse de leurs profils plasmidiques et par leur sensibilité aux antibiotiques sous forme libre et liposomale.

Le dénombrement des inclusions chlamydiennes nous 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.

Chacun des antibiotiques testés montre une bonne activité contre les trois sérotypes de *C. trachomatis* analysés.

Les valeurs des CMI et des CMB obtenues pour la doxycycline, l'érythromycine et la rifampicine sous forme libre dans notre étude (Tableau VIII), concordent avec celles rapportées dans la littérature (Ehret et coll., 1993). Le tableau VIII montre qu'il y a une ressemblance marquée au niveau de l'activité de chacun des antibiotiques testés vis-à-vis les différents sérotypes étudiés.

Les CMI de la doxycycline et de l'érythromycine pour chacun des sérotypes testés sont identiques.

Parmi les 3 antibiotiques étudiés, la rifampicine présente les CMI les plus basses.

La détermination de la CMB nous permet de savoir si un corps bactérien reste encore microbiologiquement actif dans la cellule après 72 h de contact avec l'antibiotique. La

CMB permet de voir si la bactérie a été simplement inhibée par l'antibiotique ou au contraire détruite.

Les valeurs des CMB sont toujours d'une dilution supérieure à celle de la CMI correspondante à l'exception du sérotype L2 traité avec la doxycycline et pour lequel la CMB est à quatre dilutions supérieures à la CMI. Les CMB pour la rifampicine sont identiques aux CMI ou à une dilution plus grande.

La figure 11, nous montre l'effet de la doxycycline à une concentration sous-inhibitrice de 0,015 µg/ml, soit deux dilutions inférieures à la valeur de la CMI. Après contact de 72 h avec la doxycycline, les formes chlamydiennes typiques disparaissent et sont remplacées par des inclusions de taille petite ne contenant que des CR avec une paroi souvent ballonnisée et des rares CE. Ces observations pourraient suggérer qu'un des modes d'action de la doxycycline serait d'empêcher la multiplication des CR sans intervenir dans la transformation des CE en CR. Des observations similaires aux nôtres ont été rapportées par d'autres auteurs (Dailloux et coll., 1994).

L'action des antibiotiques sur la croissance des Chlamydiae altère le nombre et la taille des inclusions chlamydiennes intracytoplasmiques. Les inclusions diminuent très rapidement en taille et en nombre en présence des concentrations croissantes d'antibiotique. Parfois à une dilution juste avant la CMI les Chlamydiae se limitent à un petit point. Ceci rend la lecture des CMI et des CMB très longue, subjective et fastidieuse et il devient difficile parfois de différencier une petite inclusion d'une petite vacuole cellulaire. Ces difficultés, déjà évoquées (Bianchi et coll., 1996), expliquent parfois les différences dans les valeurs des CMI et des CMB obtenues d'un laboratoire à un autre pour certains antibiotiques. La technique pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques pour les Chlamydiae et pour tous les autres parasites intracellulaires obligatoires n'est pas encore standardisée. Ceci rend la comparaison entre les différentes études complexe, non seulement du fait des

variations de l'inoculum utilisé, mais aussi celle du type de cellules utilisées, des supports (tubes à lamelles, plaques ou microplaques), du réactif permettant la révélation des inclusions et enfin de la lecture.

Au stade de l'infection où nous colorons les tapis infectés, soit 48 h (sérotypage L2) ou 72 h (sérotypage A et D) après infection, nous pouvons voir que la population chlamydiennne est formée en grande partie par des CE, des quelques CR et des formes intermédiaires (figures 12 et 13). Pour bien voir les CR, il aurait fallu colorer les cellules infectées à environ 24 h après l'infection. En effet, le temps 24 h correspond à la phase de multiplication active des Chlamydiae sous la forme de CR, ce qui se traduit par la présence de nombreuses formes en cours de division. Le temps 48 h, correspond à la phase de maturation des CR qui progressivement se transforment en CE. Après la lyse bactérienne, seuls les CE pourront infecter d'autres cellules.

Le taux d'encapsulation de la doxycycline dans les liposomes de charge positive a été déterminé par la méthode microbiologique. Cette méthode a l'avantage de permettre aussi l'appréciation de l'activité antibactérienne des formulations liposomales. Cette activité antibactérienne a été vérifiée avec *Bacillus subtilis* ATCC 6633 comme organisme test.

Nous avons trouvé un pourcentage d'encapsulation de 13,1%. Quand on compare l'activité antichlamydiennne de la doxycycline encapsulée avec la doxycycline libre, on observe (tableau IX) une meilleure activité antichlamydiennne de la doxycycline liposomale par rapport à sa forme libre. La doxycycline liposomale agit à une concentration 2 fois inférieure à celle de l'antibiotique libre.

La formulation liposomale inhibe de façon plus importante la croissance chlamydiennne que sa forme libre (tableau X). Par ailleurs, deux autres études ont comparé l'effet des antibiotiques encapsulés sur la croissance chlamydiennne in vitro. Al-Awahdi et coll.,

(1992), ont montré que la tétracycline encapsulée dans les liposomes positifs, négatifs et neutres étaient respectivement 10, 2 et 20 fois plus active que sa forme libre sur le sérotype L2 de *C. trachomatis* in vitro. Plus récemment Sangaré et coll., (1999), ont encapsulé la doxycycline et la tétracycline dans différentes formulations des liposomes. Ils ont montré que la tétracycline encapsulée dans les liposomes négatifs et neutres avaient respectivement une activité inhibitrice 10 et 4 fois supérieure à la tétracycline sous forme libre et que la doxycycline encapsulée dans les liposomes positifs, négatifs et neutres étaient respectivement 2, 6 et 2 fois plus actifs que leur forme libre sur la croissance du sérotype L2 de *C. trachomatis* in vitro.

En générale, le fait d'encapsuler les antibiotiques dans les liposomes augmente leur activité inhibitrice sur la croissance bactérienne par rapport à leur forme libre. Cette meilleure activité inhibitrice serait liée non pas à l'amélioration des fonctions phagocytaires intrinsèques des cellules, mais à l'augmentation de la pénétration des formulations liposomales dans ces phagocytes et de la modification de leur distribution dans les sous-compartiments cellulaires (Stevenson et coll., 1983).

Il est possible que le mécanisme par lequel les liposomes délivrent leur contenu à l'intérieur des cellules soit par fusion avec la membrane cellulaire (Al-Awadhi, 1992).

Les membranes des vésicules lipidiques peuvent venir fusionner avec les membranes des cellules. Il y a intégration des bicouches lipidiques des vésicules dans la membrane cytoplasmique, alors que le contenu des liposomes est déversé dans le cytoplasme des cellules (Batzri et coll., 1975; Ostro, 1987; Karlowsky et coll., 1992).

Un autre mécanisme possible d'interaction liposomes-cellules in vivo est l'endocytose. Après phagocytose des liposomes par les macrophages, il y a un processus de dégradation intralysosomiale des phospholipides et libération du contenu liposomiale. Le contenu des liposomes agit selon la dose, sur les organites ou diffusent à travers les membranes

lysosomiales pour atteindre les autres compartiments cellulaires (Batzri et coll., 1975, Dukstra et coll, 1985; Ravaoarino et coll., 1993).

Nous avons été capables d'isoler à l'aide de la technique de Birnboim et Doly (Birnboim et coll., 1979), des plasmides chez *C. trachomatis*.

L'analyse de l'ADN plasmidique chlamydien sur gel d'électrophorèse nous montre la présence de trois bandes plasmidiques pour chacun des trois sérotypes étudiés (sérotypes A, D et L2). Ces bandes représenteraient probablement trois conformations différentes du même plasmide.

La présence d'un seul plasmide cryptique d'environ 7,5 kpb a été démontrée par plusieurs auteurs dans quasiment tous les sérotypes de *C. trachomatis*. Les trois bandes obtenues ne sont pas trois plasmides mais seraient trois conformations différentes. On observe aussi des profils assez semblables entre chacun des trois sérotypes.

De plus, d'autres auteurs (Peterson et coll., 1983; Hyypiä et coll., 1984; Palmer et coll., 1986), avaient déjà fait mention de l'existence des ces trois conformations et ils avaient démontré que le plasmide chlamydien peut aussi exister sous forme dimérique ou multimérique.

Commanducci et coll., (1990), avaient démontré par l'analyse comparative des séquences nucléotidiques plasmidiques, un haut degré de conservation de séquence entre le biovar trachome et le biovar LGV, avec moins de 1% de variation nucléotidique. Les travaux de Commanducci et coll., (1990), avaient démontré aussi que la taille du plasmide chlamydien était uniforme en taille à environ 7500 nucléotides encodant 8 fragments de lecture ouverte (ORF : Open Reading Frames).

Nous avons digéré l'ADN plasmidique de chacun de sérotypes de *C. trachomatis* étudiés (A, D et L2), avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI (Figure3). L'analyse de leurs profils sur gel d'agarose montre que chacun des trois sérotypes possède des profils de

restriction similaire. La digestion avec EcoRI produit deux fragments de restriction alors que la digestion avec BamHI en donne un seul. La digestion du plasmide chlamydien par l'enzyme BamHI permet de linéariser le plasmide et de pouvoir le voir sous sa forme originale (Peterson et coll., 1983).

La taille du plasmide est à peu près identique pour chacun des sérotypes analysés.

Palmer et Falkow (1986), ont analysé le plasmide de 8 différents sérotypes de *C. trachomatis*. La comparaison des profils de restriction obtenus a montré que tous les sérotypes analysés ont un plasmide d'environ 7,4 kpb et que tous ces sérotypes ont un patron de restriction très similaire. Ils ont aussi montré que chaque plasmide contient un seul site BamHI, trois sites EcoRI et 8 sites HindIII.

L'analyse des protéines totales chlamydiennes des 3 sérotypes A, D et L2, nous a permis de constater que *C. trachomatis* possède un grand nombre des protéines mais qu'un petit pourcentage de celles-ci comptent pour la majorité de la masse protéique totale.

Bini et coll., (1996), ont analysé les protéines totales chlamydiennes après coloration du gel par le nitrate d'argent. Ils ont pu détecter approximativement 600 protéines différentes chez les Chlamydiae. Nous avons utilisé le Bleu de Coomassie pour la coloration des nos protéines. Ce dernier est un colorant beaucoup moins sensible que celui au nitrate d'argent. Dans notre étude, seul un nombre très limité des protéines principales ont pu être détectées par la coloration au Bleu de Coomassie. La MOMP est la protéine majeure. En effet, la MOMP représente 60% du poids sec de la membrane externe. D'autres protéines abondantes chez les Chlamydiae sont la protéine de la membrane externe de 60 kDa, une protéine ayant une masse de 29 kDa et la protéine de 12-12,5 kDa. On distingue chez chacun des sérotypes des protéines mineures avec des poids moléculaires d'environ 98,0 kDa, 40,0 kDa et 20,0 kDa.

Le profil de chacun des sérotypes étudiés est complexe à analyser à cause du grand nombre des protéines présentes, il demeure qu'il est similaire pour chacun des trois sérotypes (figure 4).

Les profils protéiques de chacun des 15 serovars chlamydiens ont été comparés par SDS-PAGE (Newhall et coll., 1982). Ces études ont montré une grande similarité des profils protéiques chez les 15 serovars analysés. Des résultats similaires ont été aussi décrits par d'autres auteurs (Salari et Ward, 1981 et Caldwell et coll., 1981).

Nous avons utilisé le modèle établi par Beatty et coll., (1993), pour notre étude sur la persistance in vitro (Beatty et coll., 1993).

Malgré certaines difficultés à induire nos souches normales à l'état persistant, il a été trouvé après plusieurs essais que le cycloheximide, que nous ajoutons au milieu de culture des *Chlamydiae* bloque l'action de l'IFN- γ sur la croissance chlamydienne dans nos expériences préliminaires.

Malgré la diminution du nombre des cellules infectées et de la taille et la forme des *Chlamydiae* après traitement des cellules avec des doses croissantes d'IFN- γ en présence de cycloheximide, on n'observe pas la forme caractéristique des sérotypes persistants et cela même à des concentrations d'IFN- γ de 50,0 ng/ml. Les formes atypiques que nous observons ont une taille plus réduite que les inclusions de type normales. On remarque aussi que les inclusions chlamydiennes contiennent moins des *Chlamydiae* à l'intérieur, mais ces inclusions ne présentent pas la morphologie aberrante caractéristique des formes persistantes soit des petites inclusions contenant des corps réticulés non différenciés de forme élargie et absence des corps élémentaires infectieux.

Le cycloheximide a été toujours ajouté au milieu de culture lors de la croissance des Chlamydiae pour inhiber la synthèse protéique des cellules hôtes et ainsi arrêter leur croissance. Cependant, nous avons observé que l'ajout du cycloheximide interrompait le développement de l'état de persistance.

Ces résultats nous indiquent que la synthèse protéique de l'hôte était requise pour le développement de l'infection persistante médié par l'IFN- γ . Ces observations sont similaires aux résultats d'autres études publiées sur l'inhibition de l'activité de l'IFN- γ par le cycloheximide (Byrne et coll., 1989).

En s'adaptant au milieu intracellulaire, les Chlamydiae auraient réduit le nombre des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés.

La croissance chlamydienne dépend de la compétition entre la cellule hôte et les Chlamydiae. Les CR en division doivent entrer en compétition avec les cellules hôtes car les réservoirs métaboliques de l'hôte sont aussi ceux utilisés par les Chlamydiae pour la biosynthèse de leurs métabolites.

Le traitement des cellules infectées par l'IFN- γ inhibe la croissance de *C. trachomatis* par l'induction d'indoléamine 2,3-dioxygénase IDO, enzyme qui catalyse la dégradation du tryptophane par conséquent limitant la disponibilité de cet acide aminé pour les Chlamydiae (Byrne et coll., 1986; Carlin et coll., 1989). Cet acide aminé est essentiel pour la croissance des souches du biovar trachoma de *C. trachomatis*, sa réduction interfère avec plusieurs processus métaboliques, entre autres l'achèvement du cycle de développement chlamydien.

La différenciation des CE en CR n'est pas affectée par le traitement à l'IFN- γ , par contre, l'IFN- γ affecte la croissance normale des CR, leur division et leur différenciation en CE infectieux. Cet arrêt de la différenciation des CR en CE, provoque l'apparition des formes élargies atypiques, non infectieuses, distinctes des CE et des CR et morphologiquement

similaires à celles induites par le traitement à la pénicilline des cellules infectées (Beatty et coll., 1993).

Bien que les Chlamydiae possèdent toute la machinerie cellulaire pour la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines, ces organismes dépendent de l'hôte pour l'acquisition des précurseurs métaboliques tels que les nucléotides et les acides aminés. Ces bactéries sont dans une compétition continue avec l'hôte pour les vitamines, les nutriments et les cofacteurs.

Le milieu de culture utilisé pour les Chlamydiae est le milieu essentiel minimal Eagle, il contient du tryptophane à une concentration de 10 mg/litre.

En inhibant la synthèse protéique de l'hôte, on inhibe la multiplication cellulaire, et on prévient la compétition entre l'hôte et les Chlamydiae pour le tryptophane du milieu, laissant les niveaux limités en tryptophane disponibles pour la synthèse protéique des Chlamydiae.

Le traitement des cellules à l'IFN- γ provoque une diminution des niveaux des principaux constituants structuraux des Chlamydiae tel que le LPS, la protéine de la membrane externe de 60-kDa et de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) et d'une synthèse continue de la protéine de stress de 60-kDa (hsp60). La réduction de ces composantes pourrait correspondre à la perte de l'intégrité structurale résultant en une croissance chlamydienne aberrante.

L'effet de l'IFN- γ est réversible. En effet l'ajout d'un milieu de culture complet, après retrait de l'IFN- γ rétablit la croissance normale chlamydienne.

L'effet de l'IFN- γ est dose-dépendent. En effet à des concentrations d'IFN- γ de 0,1 ng/ml, malgré une diminution légère du nombre des cellules infectées, la plupart d'inclusions

chlamydiennes sont de forme typique, dans lesquelles on observe des grosses inclusions contenant des CE et des CR en division.

À des concentrations de 0,2 et 0,5 ng/ml on n'observe que très peu d'inclusions typiques. La plupart présentent une morphologie caractéristique des formes persistantes avec une légère diminution de la taille des inclusions, des CR de forme élargie non différenciée et pas des CE infectieux visibles.

À des concentrations supérieures à 1,0 ng/ml d'IFN- γ , on observe une disparition de plus en plus grande du nombre des Chlamydiae. On n'observe plus d'inclusions typiques apparentes et une disparition presque complète des formes persistantes. Les formes atypiques qui restent sont des inclusions presque vides et de très petite taille. À des concentrations élevées d'IFN- γ (4,0 et 8,0 ng/ml) il y a inhibition presque complète des Chlamydiae. On remarque aussi qu'à des concentrations élevées d'IFN- γ les cellules hôtes arrêtent de se multiplier. Les concentrations élevées d'IFN- γ inhibent la croissance chlamydienne, alors que les concentrations faibles d'IFN- γ induisent l'apparition des formes intracellulaires persistantes aberrantes (Beatty et coll., 1993). Des concentrations élevées d'IFN- γ agissent aussi sur la multiplication et la division des cellules hôtes.

Nous avons comparé les profils protéiques de la souche chlamydienne de sérotype A induite persistante par traitement à l'IFN- γ avec la souche A normale.

La souche persistante montre une baisse de l'expression de la MOMP ainsi que de la protéine de la membrane externe de 60 kDa. Les souches persistantes ont une synthèse continue de la protéine de stress hsp60. Cette protéine n'est pas une protéine majeure chez les Chlamydiae, la position exacte de cette protéine n'a pas pu être déterminée avec exactitude car elle a aussi un poids moléculaire semblable à celui de la protéine de la

membrane externe de 60 kDa. Pour pouvoir déterminer la présence et la position exacte de cette protéine il aurait fallu faire de l'immunoblot et la détecter à l'aide des anticorps dirigés contre cette protéine.

Nous avons effectué le test de sensibilité aux antibiotiques pour la souche chlamydienne induite persistante par traitement à l'IFN- γ . La présence d'inclusions chlamydiennes à toutes les concentrations de doxycycline sous forme libre et sous forme liposomale testées ont été mise en évidence (Tableau XIX).

Beatty et coll., (1993), avaient déjà soupçonné, que les formes chlamydiennes persistantes ne répondaient pas aussi bien aux antibiotiques que les formes normales (Beatty et coll., 1994). On sait que les formes persistantes contiennent des taux réduits de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP). La MOMP, non seulement joue un rôle d'antigène, stimulant une immunité protectrice, mais aussi la MOMP possède une fonction de porine (C de Sa., 1996). Avec des taux réduits de MOMP, comme on trouve dans les formes persistantes, les grosses molécules hydrophiles, incluant beaucoup d'antibiotiques, pourraient ne pas être transportées aussi efficacement à l'intérieur des Chlamydiae (Beatty et coll., 1994).

C. trachomatis étant une bactérie intracellulaire obligatoire, les antibiotiques susceptibles d'avoir une activité bactéricide doivent traverser plusieurs membranes, celles de la cellule hôte, celles de la vacuole et celles de la bactérie.

Les tétracyclines entrent dans les cellules eucaryotes par diffusion passive à travers la membrane cytoplasmique en suivant un gradient de concentration (Brown et coll., 1978). Il a été montré que les tétracyclines sont concentrées à l'intérieur des cellules HeLa à 287% (Brown et coll., 1978).

Les tétracyclines traversent la paroi des bactéries à Gram négatif par diffusion passive à travers les pores de la membrane externe. Ces pores sont constitués des porines OmpC et OmpF (Chopra et coll., 1992; Speer et coll., 1992 et Schnappinger et Hillen., 1996). Certaines bactéries, comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa*, résistent aux tétracyclines par restriction de la perméabilité de leurs porines, alors que d'autres comme par exemple, *Escherichia coli*, procèdent à une réduction quantitative de la production des porines ou par la production des porines altérées. Ce mécanisme observé chez *Escherichia coli*, engendre une diminution de 6 à 18 fois de la sensibilité à une même tétracycline, mais assez souvent ce mécanisme, de réduction des porines ou production de porines altérées, provoque la résistance à des antibiotiques d'autres familles comme par exemple les β -lactamines et les fluoroquinolones (Speer et coll., 1992). Par analyse au microscope optique, on peut voir que plus on s'éloigne de la CMI de l'antibiotique pour la souche normale de *C. trachomatis* (0,6 $\mu\text{g/ml}$), plus les inclusions restantes sont de forme atypique. Ces formes ont des inclusions de plus petite taille que les formes normales, contenant très peu des Chlamydiae à l'intérieur des inclusions; on peut donc voir que même s'il y a présence des inclusions à des concentrations élevées de doxycycline, ces inclusions n'ont que très peu des particules infectieuses et pas de CR en division.

Le retrait de l'antibiotique du milieu de culture de *C. trachomatis* durant le test pour la détermination de la CMB a permis de voir, qu'un faible pourcentage des organismes qui apparaissent résistants après la première exposition à l'antibiotique(CMI) puissent se multiplier et former des inclusions typiques après le retrait de l'antibiotique du milieu de culture (CMB).

Un nombre très réduit des Chlamydiae apparaissent résistant à des concentrations élevées d'antibiotique. En effet moins de 1% des Chlamydiae sont capables de survivre à des concentrations supérieures à 0,06 µg/ml.

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par d'autres auteurs avec des souches cliniques de *C. trachomatis* résistantes à la tétracycline, la doxycycline, l'érythromycine (Jones et coll., 1990, Lefèvre et coll., 1997), à la doxycycline, à l'azythromycine et à l'ofloxacin (Somani et coll., 2000).

Ces auteurs ont appelé ce type de résistance, une résistance hétérotypique; dans laquelle la population chlamydienne contient un mélange des souches sensibles et des souches résistantes. Ainsi, bien qu'il soit possible que tous les organismes à l'intérieur de la population soient capables d'exprimer la résistance, seulement une petite proportion exprime la résistance en même temps (Somani et coll., 2000).

L'analyse au microscope optique, nous a montré que lors de la détermination de la CMI, à des concentrations sub-inhibitrices de doxycycline, un mélange des inclusions typiques et atypiques a été observé. Plus on augmentait la concentration de doxycycline moins il y avait des inclusions typiques. À partir de 0,06 µg/ml et jusqu'à 8,0 µg/ml les seules inclusions qu'on trouve sont de forme atypique.

On a pu voir que même en encapsulant la doxycycline dans des liposomes de charge positive, on n'a pas réussi à éliminer complètement l'infection persistante chlamydienne.

On remarque par contre que les formulations liposomales de la doxycycline exercent une activité inhibitrice plus importante sur la croissance chlamydienne que la doxycycline sous forme libre. En effet, même s'il reste encore des inclusions à des concentrations élevées de doxycycline liposomale, elles sont en nombre plus réduites en comparaison à celles qu'on trouve en présence de doxycycline sous forme libre. Par exemple, à la concentration la plus

élevée d'antibiotique testé, soit 8,0 µg/ml, la doxycycline liposomale exerce une activité inhibitrice 10 fois supérieure à celle de la doxycycline libre (tableau XIX). Nous n'avons pas testé des concentrations de doxycycline supérieure à 8,0 µg/ml car d'après nos expériences préliminaires, des concentrations des doxycycline supérieures à 8,0 µg/ml sont toxiques pour les cellules HeLa 229.

L'infection persistante à *C. trachomatis* pourrait être contrôlée en utilisant des formes liposomales de la doxycycline et en augmentant la dose et la durée du traitement.

Nous n'avons pas été capables d'induire le sérotype D (représentant les souches génitales) et le sérotype L2 (appartenant au serovar LGV) persistants par le traitement à l'IFN-γ. Par l'analyse des inclusions au microscope optique et par l'analyse des protéines de la membrane externe sur SDS-PAGE, il n'a pas été possible de détecter aucun changement de morphologie caractéristique des souches persistantes ni une baisse de l'expression de la MOMP. Le seul changement apparent que nous avons pu constater, a été une légère diminution de la taille des inclusions à des concentrations élevées d'IFN-γ et un nombre plus réduit des cellules infectées. Nos résultats corroborent avec ceux de Rasmussen et coll., (1996), qui n'ont pas pu démontrer le développement de la persistance chez d'autres sérotypes de *C. trachomatis* (Rasmussen et coll., 1996).

Allan et coll., (1983), ont évalué les besoins en acides aminés pour la croissance de *C. trachomatis*. Cette étude a montré que tous les sérotypes étudiés avaient besoin de leucine, de phenylalanine, de valine, d'histidine et de glutamine pour une croissance normale. Les sérotypes du biovar trachome (A, B, Ba et C) requièrent tous ces acides aminés plus du tryptophane pour une croissance normale. Ce besoin en tryptophane seulement pour les sérotypes du biovar trachome explique la raison, pour laquelle la persistance a pu être induite pour le sérotype A et non pour les sérotypes D et L2.

Des études plus récentes faites par Shaw et coll., (2000), ont montré que l'expression de plusieurs autres protéines, en plus de celles préalablement décrites, est influencée par le traitement des sérotypes du biovar trachome par l'IFN- γ . Ces auteurs ont pu voir, une baisse de l'expression des protéines de poids moléculaire de 130 kDa et de 38 kDa chez les sérotypes du biovar trachome et une hausse de l'expression des deux protéines ayant de masses moléculaires approximatives de 30 et 40 kDa chez tous les autres sérotypes de *C. trachomatis* étudiés. Ils ont identifié ces deux dernières protéines comme étant les sous-unités α et β de l'enzyme tryptophane synthétase chlamyidienne. Cette étude est intéressante car elle a probablement trouvé l'explication possible au niveau moléculaire, des différences de sensibilité envers l'IFN- γ des différents sérotypes de *C. trachomatis*. En effet, Shaw et coll., (2000), ont montré que tous les sérotypes étudiés cultivés dans des cellules HeLa, induisent la synthèse des sous-unités α et β de l'enzyme tryptophane synthétase en réponse aux traitement des cellules par l'IFN- γ . Ils suggèrent que les caractéristiques de l'état de persistance induit par l'IFN- γ observé seulement chez les sérotypes du serovar trachome (A, B, et C) et non les autres, puissent être expliqués par l'incapacité des souches du serovar trachome à synthétiser du tryptophane. L'explication moléculaire la plus plausible pour cette différence est que les sérotypes du biovar trachome possèdent une version hautement tronquée de la protéine TrpA (Shaw et coll., 2000). Dans la plupart des bactéries, les deux sous-unités de l'enzyme tryptophane synthétase sont arrangées en complexe $\alpha_2\beta_2$. La moitié des réactions exécutée par chacune des sous-unités séparément a une activité significativement moindre que la réaction physiologique exécutée par le complexe sous sa forme tétramérique. Chacune des sous-unités stimule l'activité de l'autre sous-unité. En analysant la taille de la mutation de TrpA chez les sérotypes du serovar trachome (7,7kDa) il est très possible que la structure tertiaire de la protéine, le

substrat ligand ou la communication avec TrpB soient significativement altérés, détériorant ainsi l'activité de la tryptophane synthétase (Shaw et coll., 2000). La preuve ultime de cette hypothèse serait de mesurer l'activité enzymatique de la forme tronquée de Trpa chez les sérotypes A, B et C et voir de combien l'activité est affectée en la comparant avec la forme normale de Trpa chez les autres sérotypes de *C. trachomatis*.

Cette dernière étude, indique fortement que les Chlamydiae augmentent les niveaux d'expression des ces propres enzymes nécessaires pour la synthèse du tryptophane dans le but de compenser le retrait du tryptophane causé par l'augmentation de l'expression de l'enzyme indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) chez la cellule hôte. Tout cela est supporté par l'observation que l'augmentation de l'expression des sous-unités α et β de l'enzyme tryptophane synthétase induite par le traitement à l'IFN- γ est empêchée par l'addition des quantités superphysiologiques de L-tryptophane (Shaw et coll., 1999).

Conclusion

Bien qu'il existe une multitude des évidences montrant l'existence de la persistance chlamydienne, ce phénomène est difficile à démontrer *in vivo* chez l'humain. Cette étude nous a permis de mieux comprendre le modèle de la persistance *in vitro*. Avec ce travail nous voulions faire le parallèle avec les infections à répétition chez les humains pouvant entraîner la stérilité, des grossesses extra-utérines et la cécité (trachome). Nos études sur la caractérisation des trois sérotypes de *C. trachomatis* étudiés nous ont permis de confirmer que chacun des trois sérotypes possède un plasmide d'environ 7,4 kpb. Nous avons détecté ce plasmide sur trois conformations différentes mais après digestion avec des enzymes de restriction nous avons pu l'isoler sous sa forme originale.

On a aussi pu constater que tant au niveau de leurs profils d'ADN plasmidique, de leurs profils des protéines de la membrane externe que de leur sensibilité aux antibiotiques les trois sérotypes sont assez semblables.

Nous avons pu aussi établir le modèle *in vitro* de la persistance chlamydienne.

Parmi les paramètres que nous avons étudiés dans le but de développer le modèle de la persistance *in vitro*, nous avons pu voir que ni la taille, ni le prétraitement des feuillettes cellulaires avec l'IFN- γ avant l'infection, ni la durée du traitement à l'IFN- γ avait un effet sur le développement de la persistance *in vitro*, par contre la concentration d'IFN- γ utilisée et la présence du cycloheximide dans le milieu de croissance avaient un effet marqué sur l'induction de la persistance par l'IFN- γ *in vitro*.

Tandis que des concentrations élevées d'IFN- γ inhibent la croissance chlamydienne, des faibles concentrations d'IFN- γ (0,2 à 0,5 ng/ml) induisent la formation des formes intracellulaires persistantes.

Nous avons vu que le développement de la persistance induite par le traitement à l'IFN- γ est dépendant de la synthèse protéique de la cellule hôte. En effet, la présence du cycloheximide dans le milieu de culture bloque l'action de l'IFN- γ dans nos expériences préliminaires.

Le besoin en tryptophane pour une croissance normale seulement pour les sérotypes du biovar trachome explique la raison, pour laquelle la persistance a pu être induite pour la souche chlamydienne de sérotype A et non pour celles de sérotype D et L2.

À notre connaissance, notre travail est le premier à évaluer la sensibilité aux antibiotiques sous forme libre ou liposomale sur des formes persistantes de *C. trachomatis*.

Nous avons pu constater que la souche persistante était plus résistante aux antibiotiques que sa forme à l'état normal et que même en utilisant de la doxycycline sous forme liposomale nous n'avons pas réussi à éliminer complètement l'infection persistante. Malgré cela la doxycycline sous forme liposomale montre une meilleure activité antichlamydienne que sa forme libre. En effet, même s'il reste encore des inclusions chlamydiennes à des concentrations élevées de la doxycycline sous forme liposomale, elles sont en nombre plus réduits en comparaison à celles qu'on trouve en présence de doxycycline sous forme libre.

À des concentrations élevées d'antibiotique, la doxycycline liposomale exerce une activité inhibitrice 10 fois supérieure à celle de la doxycycline sous forme libre (tableau XIX).

Nous avons montré par le test de sensibilité aux antibiotiques que l'activité des antibiotiques sur les sérotypes étudiés n'est pas totale. En effet, il reste toujours des formes résiduelles qui vont être réactivées une fois que nous aurons éliminé les antibiotiques du milieu de culture, ceci pourra expliquer l'échec de la thérapie antibactérienne chez les humains souvent rapporté dans la littérature.

Par ailleurs, si les infections chlamydiennes persistantes in vivo se présentent avec des caractéristiques similaires à celles décrits dans le modèle in vitro, la diminution de la quantité de l'antigène protecteur, tel que la MOMP et la production continue de l'antigène immunopathogène hsp60, pourraient contribuer à la stimulation de l'inflammation chronique pouvant mener à la cécité ou à l'infertilité.

Nous pensons qu'en utilisant des formes liposomales de la doxycycline et en augmentant la dose et la durée du traitement on pourrait contrôler les infections persistantes chlamydiennes.

Même si nous n'avons pas réussi à induire dans un état persistant les sérotypes chlamydiens D et L2, ceci ne signifie pas que ces sérotypes n'induisent pas d'infections persistantes in vivo. L'IFN- γ n'est pas le seul facteur pouvant affecter le cycle de développement normal des Chlamydiae. En effet, l'infection persistante peut être induite, au moins en laboratoire, par une variété des facteurs tels que des facteurs d'ordre immunitaire (FNT- α), nutritionnel (cystéine) et par la présence des antibiotiques (pénicilline, ampicilline). Ceci laisse penser que la persistance pourrait être générée par plus d'un mécanisme, et les sérotypes capables de l'établir ne sont pas limitées aux souches du biovar A, B et C de *C. trachomatis*.

Dans le futur des études plus approfondies devraient être menées pour identifier d'autres mécanismes d'induction de la persistance.

Références

Albertsson, A. C., Donaruma, L. G., and Warner, R. J. 1985. Synthetic polymers as drugs. In Tirrell, D. A., Donaruma, L.G., and Turek, A. B. (Eds.). *Macromolecules as drugs and drug as carriers for biologically active materials*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 446 :116-133.

Allan, I. and Pearce, J.H., 1983. Amino acid requirements of strains of *Chlamydia trachomatis* and *C. psittaci* in McCoy cells : relationship with clinical syndrome and host origin. J. Gen. Microbiol. 129 : 2001-2007.

Allan, L., Hatch, T. P., and Pearce, J. H. 1985. Influence of cysteine deprivation on chlamydial differentiation from reproductive to infective life-cycle forms. J. Gen. Microbiol. 131 :3171-3177.

Allen, T. M. and Chonn, A. 1987. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticulo-endothelial system. FEBS Letters. 223 :42-46.

Allen, T. M. 1988. Interactions of liposomes and other drug carriers with the mononuclear phagocyte system. In, *Liposomes as drug carriers*. (Gregoriadis G), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 37-50.

Allen, J.E., Beatty, P. R., and Stephens, R.S. 1990. Recombinant fusion proteins define T-cell antigenic sites on the major membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. In. Chlamydial infections. Eds. Bowie et coll. Cambridge University Press, New York. pp 101-104.

Allison, AC. and Gregoriadis, G. 1974. Liposomes as immunological adjuvants. Nature (London). 252 :252-253.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5350-5354.

An, Q., Radcliffe, G., Vassallo, R., Buxton, D., O'Brien, J. W., Pelletier, D. A. and Olive, D. M. 1992. 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.

Arno, J. N., Yuan, Y., Cleary, R. E., Morrison, R. P. 1995. Serologic responses of infertile women to the 60-kDa chlamydial heat shock protein. Fertil. Steril. 64 : 730-735.

Bader, J. P., and Morgan, H. R. 1961. Latent viral infection of cells in culture. VII. Role of water soluble vitamins in psittacosis virus propagation in L cells. J. Exp. Med. 113 : 271-281.

Baghian, A., Shaffer, L., and Storz, J. 1990. Antibody response to epitopes of chlamydial major outer membrane proteins on infectious elementary bodies and of the reduced polyacrylamide gel electrophoresis-separated form. *Infect. Immun.* 58 : 1379-1383.

Baker, R. R., Czopf, L., Jilling, T. and Freeman, B. A. 1992. Quantitation of alveolar distribution of liposome-entrapped antioxidant enzymes. *Ann. J. Physiol.* 263 : 585.

Bakker-Woudenberg, IAJM., Lokerse, A., Roerdink, F., Regts, D., and Michel, M. 1985. Free versus liposome-entrapped ampicillin in treatment of infection due to *Listeria monocytogenes* in normal and athymic (nude) mice. *J. Infect. Dis.* 151 :917.

Bangham, A. D., Hill, M. V., and Miller, NGA. 1974. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In : Korn ED, ed. *Methods in membrane biology*. Vol. 11. New York : Plenum Press, 1-68.

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

Barbour, A. G., Amato, K. I., Hacksstadt, T., Perry, L. and Caldwell, H. D. 1982. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J. Bacteriol.* 151 : 420-428.

Barron, A. L. (ed.) 1988. *Microbiology of Chlamydia*. Boca Raton, FL : CRC Press.

Batteiger, B. E., Newhall, W. J., Terno, V. P., and Jones, R. B. 1986. Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* with murine monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 53 : 530-533.

Batteiger, B. E., Fraiz, J., Newhall, W. J., Katz, B. P., and Jones, R. B. 1989. Association of recurrent chlamydial infection with gonorrhoea. *J. Infect. Dis.* 159 : 661-669.

Batzri, S., Korn, E. D. 1975. Interaction of phospholipid vesicles with cell, endocytosis and fusion as alternates mechanism for uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. *J. Cell Biol.* 66 :671-734.

Beale, A. S. 1997. Does *Chlamydia trachomatis* MoPn enter a microbiologically-inapparent state during experimental infection of the mouse genital tract? *Microb. Pathog.* 22 : 99-112.

Beatty, W. L., Belanger, T. A., Desai, A. A., Morrison, R. P. and Byrne, G. I. 1994. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated Chlamydial persistence. *Infect. Immun.* 62 : 3705-3711.

Beatty, W. L., Byrne, G. I., and Morrison, R. P. 1993. Morphologic and antigenic characterization of interferon γ -mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 3998-4002.

Beatty, W. L., Morrison, R. P., and Byrne, G. I. 1994. Immunoelectron-microscopic quantitation of differential levels of Chlamydial proteins in a cell culture model of persistent *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect. Immun.* 62 : 4059-4062.

Beatty, W.L., Morrison, R. P. and Byrne, G. I. 1994. Persistent Chlamydiae : from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 58 : 686-699.

Beatty, W. L., Morrison, R. P. and Byrne, G. I. 1994. Repeated and persistent infection with Chlamydia and the development of chronic inflammation and disease. *Trends in Microbiology.* 2 : 94-98.

Bedson, S. P. 1936. Observations bearing on the antigenic composition of the psittacosis virus. *Br. J. Exp. Pathol.* 17 : 109-117.

Bejan, A., and Turcu, G. R. 1995. Liposomes : presentation and actual applicative trends in medicine. *Rev. Roum. Méd. Int.* 33 : 3-4, 141-149.

Bell, T. A., Stamm, W. E., Kuo, C. C., Holmes, K. K. and Grayston, J. T. 1986. Chronic *Chlamydia trachomatis* in infants. In : Oriel, D., Ridgway, G., Schachter, J., Taylor-Robinson, D., Ward, M. eds. Chlamydial infections. Proceedings of the Sixth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Sanderstead, Surrey, June 15-21, 1986. Cambridge, England : Cambridge University Press, 1986:305-8.

Berman, JD., Hanson, WL., Chapman, WL. and Alving, CR. 1986. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 : 847.

Bianchi, A., Scieux, C., Robache, S., Vassias, I., et Perol, Y. 1991. Étude comparative des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales léthales (CML) de la tétracycline, de la minocycline, de l'érythromycine et de la rokitamycine sur onze souches de *Chlamydia trachomatis*. *Path. Biol.* 39 : 442-446.

Bini, L., Sanchez-Campillo, M., Santucci, A., Magi, B., Marzocchi, B., Commanducci, M., Christiansen, G., Birkelund, S., Cevenini, R., Vretou, E., Ratti, G., et Pallini, V. 1996. Mapping of *Chlamydia trachomatis* proteins by immobilized-polyacrylamide two-dimensional electrophoresis: spot identification by N-terminal sequencing and immunoblotting. *Electrophoresis.* 17, 185-190.

Birkelund, S. 1992. The molecular biology and diagnostics of *Chlamydia trachomatis*. *Danish Medical Bulletin* 39 : 304-320.

Birkelund, S., Stephens, R. S. 1992. Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by pulse-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 174 : 2742-2747.

Birnboim, H. C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 7 : 1513-1522.

Black, C. M. 1997. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin. Microbiol. Rev. 10 : 160-184.

Bonventre, P., Gregoriadis, G. 1978. Killing of intraphagocytic *Staphylococcus aureus* by dihydrostreptomycin entrapped with liposomes. Antimicrob. Agents Chemother. 13 : 1043.

Brajtburg, J., Elberg, S., Bolard, J., et coll. 1984. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. J. Infect. Dis. 149 : 986-997.

Brown, K. N. and Percival, A. 1978. Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 14, 251.

Brunham, R. C. and Peeling, R. W. 1994. *Chlamydia trachomatis* antigens : role in immunity and pathogenesis. Infect. Agents and Diseases. 3 : 218-230.

Brunham, R. C., Peeling, R., Maclean, I., Kosseim, M. L., and Paraskevas, M. 1992. *Chlamydia trachomatis*-associated ectopic pregnancy : serologic and histologic correlates. J. Infect. Dis. 165 : 1076-81.

Byrne, G. I., Lehmann, L. K., and Landry, G. J. 1986. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. Infect. Immun. 53 : 347-351.

C De Sa. 1996. La protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia* : structure et fonctions. *Vet. Res.* 27 : 317-331.

Caldwell, H. D., Kromhout, J., and Schachter, J. 1981. Purification and partial characterisation of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 31 : 1161-1176.

Carlin, J. M., Borden, E. C., Sondel, P. M. and Byrne, G. I. 1989. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J. Interferon Res.* 9 : 329-337.

Castora, F. J. 1989. Western Blotting of Proteins. *Clinical Biotechnology.* 1 : 43-48.

Cates, Jr., W & Wasserheit, J. N. 1991. Genital chlamydial infections : epidemiology and reproductive sequelae. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164 : 1771-1781.

Chapman, WL., Hanson, WL., Alwing, CR., and Hendricks, LD. 1984. Antileishmanial activity of liposomes encapsulated meglumine antimoniate in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 45 : 1028.

Cheema, M. A., Schumacher, H. R., and Hudson, A. P. 1991. RNA-directed molecular hybridization screening : evidence for inapparent chlamydial infection. *Am. J. Med. Sci.* 302 : 261-268.

Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., and Ames, B. N. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*. 41 : 753-762.

Clark, R. B., Schatzki, P. F., and Dalton, H. P. 1982. Ultrastructural analysis of the effects of erythromycin on the morphology and developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* HAR-13. *Arch. Microbiol.* 133 : 278-282.

Centers for disease control and prevention. 1993. 1993 sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 42(RR-14) : 4-5.

Cervinini, R., Donati, M., and La Placa, M. 1988. Effects of penicillin on the synthesis of membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* LGV2 serotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 56 : 41-46.

Coles, A., Harper, A., and Pearce, P. H. 1993. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development : a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol. Lett.* 106 : 193-200.

Coune, A. 1988. Liposomes as drug delivery system in the treatment of infectious diseases. Potential applications and clinical experience. *Infection* 16 : 141-147.

Dailleux, M., Kohler, Ch., Laurain, C., Le Faou, A., and Grignon, G. 1994. Observations en microscopie électronique de l'action de l'érythromycine, doxycycline et ofloxacin sur le cycle de multiplication de *Chlamydia trachomatis*. *Path. Biol.* 42 : 399-405.

Dailloux, M., Villemain, P. 1992. Activités bactériostatiques et bactéricides des cyclines, macrolides et fluoroquinones sur *Chlamydia trachomatis*. Path. Biol. 40 : 455-460.

Dan, M., Rotmensch, H. H., Eyland, E., Rubinstein, A., Ginsberg, R. and Liron, M. 1980. A case of lymphogranuloma venereum of 20 years' duration. Br. J. Vener. Dis. 56 : 344-346.

Davis, D., Denis, A., Gregoriadis, G. 1987. Liposomes as adjuvants with immunopurified tetanus toxoid : the immune response. Immunol. Lett. 14 : 341-348.

Davies. H. D. Wang, E. E. L. with the Canadian Task Force on Periodic Health Examination. Periodic Health examination, 1996 uptake : 2. Screening for chlamydial infections. Can. Med. Assoc. J. 154 : 1631-1644, 1996.

Dawson, C. R., Jones, B. R., Tarizzo, M. L. 1981. Guide to trachoma control in programmes for the prevention of blindness. Geneva : World Health Organization.

Deamer, D. W., and Uster, P.S. 1983. Liposome preparation. (Ostro M. J., Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 27.

Deamer, D. W., Bangham, A. D. 1976. Large volume liposomes by ether vaporization method. Biochim. Biophys. Acta. 443 : 629.

Donaruma, L.G., and Warner, R.J. 1985. Some biologically active (Thiosemicarbazides). In Tirrell, D.A., Donaruma, L.G. And Turek, AB. (Eds.). Macromolecules as drugs and drug as carriers for biologically active materials. Ann. N.Y. Acad. Sci. 446 : 116-133.

Dukstra, J., Van Gallen, M., Regts, J. and Scherphof, G. L. 1985. Uptake and processing of liposomal phospholipids by Kupffer cells in vitro. Eur. J. Biochem. 148 : 391-397.

Ehret, J. M. and Judson, F. N. Chlamydiae. In : Raoult D. Antimicrobial agents and intracellular pathogens, pp. 201-230, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1993.

Elorza, B., Elorza, M. A., Sainz, M. C., Chantres, J. R. 1993. Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations. J. Microencapsul. 10 : 237-248.

Fountain, M. W., Weiss, S. K., Fountain, A. G., Shen, A., Lenk, R. P. 1985. Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in vitro and in vivo by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. J. Infect. Dis. 152 : 529-535.

Fox, A., Rogers, J. C., Gilbert, J., Morgan, S., and Wyrick, P. B. 1990. Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. Infect. Immun. 58 : 835-837.

Fukushi, H., and Hirai, K. 1988. Immunochemical diversity of the major outer membrane protein of avian and mammalian *Chlamydia psittaci*. J. Clin. Microbiol. 26 : 675-680.

Garrett, A. J., Harrison, M. J., and Manire, G. P. 1974. A search for the bacterial mucopeptide component muramic acid in Chlamydia. *J. Gen. Microbiol.* 80 :315-318.

Gerbase, A. C., Rowley, J. T. & Mertens, T. E. 1998. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 351 (Suppl III) : 2-4, 1998.

Graybill, JR., Craven, PC., Taylor, RL., Williams, D. M., and Magee, WE. 1982. Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. *J. Infect. Dis.* 145 : 748-52.

Grayston, J. T., Kuo, C. C., Campbell, A., Wang, S. P. 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for Chlamydia strain TWAR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 : 88-90.

Gregoriadis, G. 1979. Liposomes. In Gregoriadis, G. (Ed.), *Drug carriers in biology and medicine*. Academic Press, New York, Ch. 14.

Gregoriadis, G. 1985. Liposomes for drugs and vaccines. *Trends Biotechnol.* 3 : 235-241.

Gregoriadis, G., Davis, D., Davies, A. 1987. Liposome as immunological adjuvants : antigen incorporation studies. *Vaccine.* 5 :145.

Gregoriadis, G. 1989. Targeting of drugs : implications in medicine. *Horiz. Biochem. Biophys.* 9 : 1-35.

Gregoriadis, G. 1993 (Ed). *Liposome Technology*, 2nd ed., CRC Press Inc, Boca Raton.

Gregoriadis, G., Florence, A. T. 1993. Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs*. 45(1) : 15-28.

Hackstadt, T., Todd, W. J., and Caldwell, H. D. 1985. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein : role in the differentiation of Chlamydiae? *J. Bacteriol.* 161 : 25-31.

Halberstaeder, L., Von Prowazek, S. 1907. Aetiologie des Trachom. *Dtsch. Med. Wschr.*, 33 : 1285-1287.

Hanna, L., Dawson, C. R., Briones, O., Thygeson, P., and Jawetz, E. 1968. Latency in human infections with TRIC agents. *J. Immunol.* 101 : 43-50.

Hammerschlag, M. R. 1982. Activity of trimethoprim-sulfamethoxazole against *Chlamydia trachomatis* in vitro. *Rev. Infect. Dis.* 4 : 500-505.

Hatch, T. P. 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins :the functional equivalent of peptidoglycan in Chlamydiae? *J. Bacteriol.* 178 :1-5.

Hatch, T. P., Allan, I., and Pearce J. H. 1984. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of Chlamydia spp. *J. Bacteriol.* 157 : 13-20.

Hatch, T. P., Vance Jr. D. W. and Al-Hossainy, E. 1981. Identification of a major envelope protein in *Chlamydia* spp. *J. Bacteriol.* 157 : 426-429.

Hayes, L. J., Pecharatana, S., Bailey, R. L., Hampton, T. J., and Ward, M. E. 1995. Extent and kinetics of genetic change in the omp 1 gene of *Chlamydia trachomatis* in two villages with endemic trachoma. *J. Infect. Dis.* 172 : 268-272.

Hayes, L. J., Yearsley, P., Treharne, J. D., Ballard, R. A., and Ward, M. E. 1994. Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the major outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 62 :5659-5663.

Hightower, L. E. 1991. Heat shock stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 56 : 191-197.

Hills, S. D., Nakashima, A., Marchbanks, P. A., Addiss, D. G. & Davis, J. P. 1994. Risk factors for recurrent *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170 : 801-806.

Holland, S. M., Hudson, A. P., Bobo, L., Whittum-Hudson, J. A., Viscidi, R. P., Quinn, T. C. and Taylor, H. R. 1992. Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state. *Infect. Immun.* 60 : 2040-2047.

Hope, M. J., Ball, M. B., Webb, G., Cullis, P. R. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 812 : 55-65.

Hudson, A. P., Mcentee, C. M., Reacher, M., Whittum-Hudson, J. A., and Taylor, H. R. 1992. Inapparent ocular infection by *Chlamydia trachomatis* in experimental and human trachoma. *Curr. Eye Res.* 11 : 279-283.

Jones, R. B., Mammel, J. E., Shepard, M. D. et coll. 1986. Recovery of *Chlamydia trachomatis* from the endometrium of women at risk for chlamydial infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155 : 35-39.

Jones, R. B. 1991. New treatments for *Chlamydia trachomatis*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164 : 1789-1793.

Jones, R. B., Van Der Pol B., Martin, D. H. 1990. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J. Infect. Dis.* 162 : 1309-1315.

Joseph, T., Nano, F. E., Garon, C. F. and Caldwell, H. D. 1986. Molecular characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* plasmids. *Infect. Immun.* 51 : 699-703.

Juliano, R. L., Layton, D. 1980. In drug delivery systems : characteristic and biomedical applications. London : Oxford University Press, 1980 : 189-236.

Juliano, R. L. 1981. Liposomes as a drug delivery system. *Trends Pharmacol. Sci.* 39-42.

Juliano R., Lopez-Berestein, G., Mehta, R., Hopfer, R. L., Kasi, L. 1983. Pharmacokinetic and therapeutic consequences of liposomal drug delivery : fluorodoxyuridine and amphotericin B. *Biol. Cell.* 47 : 39-46.

Kane, C. D., and Byrne, G. I. 1998. Differential effects of gamma interferon on *Chlamydia trachomatis* growth in polarized and nonpolarized human epithelial cells in culture. *Infect. Immun.* 66 : 2349-2351.

Karimi, S. T., Schloemer, R. H., and Wilde, C. E. 1989. Accumulation of chlamydial lipopolysaccharide antigen in the plasma membranes of infected cells. *Infect. Immun.* 57 : 1780-1785.

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

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

Kirby, C. J. 1993. Controlled delivery of functional food ingredients : opportunities for liposomes in the food industry. Dans, *Liposome technology, entrapment of drugs and other materials.* (Gregoriadis G), volume II, 2^{ème} édition, CRC0 Press Inc. Boca Raton, pp. 215-232.

Klein, R. A. 1970. The detection of oxidation products in liposome preparation. *Biochim. Biophys. Acta.* 210 : 486.

Kuo, C. C. 1972. Primary isolation of TRIC organism in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *J. Inf. Dis.* 125(6) : 665-668.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227 : 680-685.

Lopez-Berestein, G., Mehta, R., Hopfer, RL., and Juliano, R. 1983. Effects of sterols on the therapeutic efficacy of liposomal amphotericin B in minime candidiasis. *Cancer Drug Delivery.* 1 : 37-42.

Lopez-Berestein, G. 1987. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 675-78.

Macdonald, R. I., Oku, N., Macdonald, R. C. 1983. Liposome formation re-visited. *Lipos. Lett.* 1 : 62.

Marchal-Heussler, L., Maincent, P. H., Hoffman, M., Sirbat, D. 1990. Intérêt de nouveaux vecteurs de médicaments en ophtalmologie : les liposomes et les nanoparticules. *J. Fr. Ophtalmol.* 13 : 575-582.

Matsumoto, A., and Manire, G. P. 1970. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J. Bacteriol.* 101 : 278-285.

Matsumoto, A. 1982. Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. J. Bacteriol. 151 : 1040-1042.

Meyer, K. F., and Eddie, B. 1933. Latent psittacosis infection in shell parakeets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 30 : 483-488.

McClarty, Grant. 1994. Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. Trends in Microbiol. 2 : 157-164.

McCormack, W. M. 1986. Chlamydial infections in men, pp 251-254. In Oriel D et coll., (Eds). Chlamydial infections. Proceedings of the sixth international symposium on human chlamydial infections. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

Mehta, R., Mehta, K., Lopez-Berestein, G., Juliano, R. 1985. Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes. Infect. Immun. 47 : 429.

Merigan, T. C., and Hanna, L. 1966. Characteristics of interferon induced in vitro and in vivo by a TRIC agent. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122 : 421-424.

Mondesire, R. R., Maclean, I. W., and Winston, S. E. 1989. Identification of genus-specific epitopes on the major outer membrane complexes of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* immunotypes 1 and 2. Infect. Immun. 57 : 2914-2918.

Montfoort, A., Bezstarosti, K., Groh, M. M., Metsa-ketela, T. J. 1987. The influence of the lipid composition on the degree of lipid peroxidation of liposomes. *Biochem. Inter.* 15 : 525-543.

Morgan, H. R. 1956. Latent viral infection of cells in tissue culture. I. Studies on latent infection of chick embryo tissues with psittacosis virus. *J. Exp. Med.* 103 : 37-47.

Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G., and Ames, B. N. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 8059-8063.

Morisset, R., Pechère, J. C. 1990. Les MTS. Pages 219-225.

Moulder, J. W., Levy, N. J., and Schulman, R. P. 1980. Persistent infection of mouse fibroblast (L cells) with *Chlamydia psittaci* : evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect. Immun.* 30 : 874-883.

Moulder, J. W., Hatch, T. P., Kuo, C. C., Schachter, J., Storz, J. Genus *Chlamydia*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 1. Krieg, N. R. ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984 : 729-739.

Moulder, J. W. 1991. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 55 : 143-190.

Mourad, A., Sweet, R. L., Sugg, N. & Schachter, J. 1980. Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 18 : 696-698.

Neu, RRC., Chance, ML., and Heath, S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. J. Antimicrobiol. Chemother. 8 : 371-381.

Newhall, VWJ., Batteiger, B., and Jones, R. B. 1982. Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. Infect. Immun. 38 : 1181-1189.

Newhall, VWJ., Jones, R. B. 1983. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane of Chlamydiae. J. Bacteriol. 154 : 998-1001.

Nurminen, M., Rietschel, E.T., and Brade, H. 1985. Chemical characterization of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. Infect. Immun. 48 : 573-575.

Omri, A., Ravaoarino, M., and Poisson, M. 1995. Incorporation, release and in vitro antibacterial activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 36 : 631-639.

Orfila, J., Laurans, G. 1982. Action des antibiotiques sur les Chlamydia. Rev. Intern. Trach. 1 : 9-82.

Ostro, M. J. 1987. Liposomes. Sci. Amer. 256 : 102-111.

Palmer, L. and Falkow, S. 1986. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. Plasmid 16 : 52-62.

Peeling, R. W., and Brunham, R. C. 1996. Chlamydiae as pathogens : new species and new issues. Emerging Infectious Diseases. 2 : 307-318.

Peeling, R. W., Bailey, R. L., Conway, D., Holland, M. J., Dillon, E., and Mabey, D. C. W. 1996. Antibody response to the chlamydial heat shock protein 60 is associated with scarring trachoma. 96th American Society for Microbiology meeting, New Orleans, May 1996. Abstract #2871.

Pfefferkorn, E. R. 1984. Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblast by inducing the host cell degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 908-912.

Peterson, E. M., Markoff, B. A., Schachter, J., and de la Maza, L. M. 1990. The 7.5 kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this micro-organism. Plasmid 23 : 144-148.

Phillips, N. C., Skamene, E., & Tsoukas, C. 1991. 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.

Phillips, N. C. 1992. Liposomal carriers for the treatment of acquired immune deficiency syndromes. Bull. Inst. Pasteur. 90 : 205.

Pollard, M., and Sharon, N. 1963. Induction of prolonged latency in psittacosis infected cells by aminopterin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112 : 51-55.

Poznansky, M. J., Juliano, R. L. 1984. Biological approaches to the controlled delivery of drugs : a critical review. Pharmacol. Rev. 36 : 277-336.

Prowazek Von S. 1907. Chlamydozoe. I., Zusammenfassende. Uebersicht. Arch. Protistente. 22 : 248-298.

Rake, C., Jones, H. P. 1942. Studies on lymphogranuloma venereum. I. Development of the agent in the yolk sac of the chicken embryos. J. Exp. Med., 75 : 323-335.

Rahman, Y. E., Right, B. J. 1975. Liposomes containing chelating agents. J. Cell. Biol. 65 : 112.

Rahman, M. U., Cheema, M. A., Schumacher, H. R., and Hudson, A. P. 1992. Molecular evidence for the presence of Chlamydia in the synovium of patients with Reiter's syndrome. Arthritis Rheum. 35 : 521-529.

Rasmussen, S. J., Timms, P., Beatty, R., and Stephens R. S. 1996. Cytotoxic-T-lymphocyte-mediated cytolysis of L cells persistently infected with *Chlamydia* spp. Infect. Immun. 64 : 1944-1949.

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

Ravaoarino, M., et Toma, E. 1993. Les liposomes, dans le traitement des infections. *Ann. Med. Interne.* 144 : 182-187.

Ravaoarino, M., Toma, E., Agbaba, O., and Morisset, R. 1993. Efficient entrapment of amikacin and teicoplanin in liposomes. *J. Drug Targ.* 1 : 191-195.

Reeve, P., and Taverne, J. 1968. Inhibition by pyrimidine analogues of the synthesis of folic acid by trachoma agents. *J. Hyg. Camb.* 66 : 295-306.

Rice, R. J., Vinod Bhullar, Shannon, H. Mitchell and Joan S. Knapp. 1995. Susceptibilities of *Chlamydia trachomatis* isolates causing uncomplicated female genital tract infections and pelvic inflammatory disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 : 760-762.

Ridgway, G. L. 1992. Advances in the antimicrobial therapy of chlamydia genital infections. *J. Infect.* 25 : 51-59.

Salari, S., and Ward, M. E. 1981. Polypeptide composition of *Chlamydia trachomatis*. *J. Gen. Microbiol.* 123, 197.

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

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

Sardinia, L., Segal, E., and Ganem, D. 1988. Developmental regulation of the cysteine-rich outer-membrane proteins of murine *Chlamydia trachomatis*. *J. Gen. Microbiol.* 134 : 997-1004.

Sayada, C., Vretou, E., Orfila, J., Elion, J., and Denamur, E. 1995b. Heterogeneity within the first constant segment of the major outer membrane protein gene in *Chlamydia trachomatis* Serovar D/Da distinguishes 2 lineages. *CR Acad. Sci. Serie III – Sciences de la vie – Life Sciences* 318 : 943-949.

Schachter, J. 1978. Chlamydial infections. *N. Engl. J. Med.*, 298 : 428-435, 490-495, 540-549.

Schachter, J., Moncada, J., Dawson, C. R., Sheppard, J., and Said, M. E. 1988. Nonculture methods for diagnosing chlamydial infection in patients with trachoma : a clue to the pathogenesis?. *J. Infect. Dis.* 158 : 1347-1352.

Schachter, J., and Wyrick, P. B. 1994. Culture and isolation of *Chlamydia trachomatis*. *Methods in Enzymology.* 236 : 377-390.

Scherphof, G. L. 1991. In vivo behavior of liposomes : interactions with the mononuclear phagocyte system and implications for drug targeting. Dans, Targeted drug delivery.

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 285-327.

Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C., Gregoriadis, G. 1991. Influence of surface hydrophobicity of liposomes on their interaction with plasma-protein and clearance from the circulation :studies with polyethylene glycol-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1062 : 77-82.

Sharata, H. H. and Katz, K. H. 1996. Liposomes. *Int. J. Dermatol.* 35(11) : 761-769.

Shaw, A. C., Christiansen, G., Birkelund, S. 1999. Effects of interferon gamma on *Chlamydia trachomatis* serovar A and L2 protein expression investigated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 20(4-5) : 775-780.

Shemer-Avni, Y., Wallach, D., and Sarov, I. 1989. Reversion of the antichlamydial effect of tumor necrosis factor by tryptophan and antibodies to beta interferon. *Infect. Immun* 57 : 3483-3490.

Smith, J., Walzem, R. L., and German, J. B. 1993. Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1154 : 327.

Stamm, W. E. 1999. *Chlamydia trachomatis* infections : progress and problems. *J. Infect. Dis.* 179 : S380-S383.

Stephens, R. S., Wagar, E. A., and Schoolnik, G. K. 1988. High resolution of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. J. Exp. Med. 167 : 817-831.

Stevenson, M., Baillie, A., Richards, R. 1983. Enhanced activity of streptomycin and chloramphenicol against intracellular *Escherichia coli* in the J7774 macrophage cell line mediated by liposome delivery. Antimicrob. Agents Chemother. 24 : 742.

Sunamoto, J., Goto, M., Jida, I., Hara, K., Saito, A., Tomonaga, A. 1984. Unexpected tissue distribution of liposomes coated with amylopectin derivatives and successful use in the treatment of experimental Legionnaire' disease. In: Gregoriadis, G., Poste, G., Senior, J., Trounet, A., eds. Receptor-mediated targeting of drugs. New York : Plenum Press, 1984 : 359-371.

Szoka, F., Papahadjopoulos, D. 1978. A new procedure for preparation of liposomes by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 4194.

Szoka, F., Papahadjopoulos, D. 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9 : 467-508.

Tally, F. T., Ellestad, G. A. and Testa, R. T. 1995. Glycylcyclines : a new generation of tetracyclines. J. Antimicrob. Chemother. 35 : 449-452.

Tamura, A., and Manire, G. P. 1967. Preparation and chemical composition of the cell membranes of developmental reticulate forms of meningopneumonitis organism. J. Bacteriol. 94 : 1184-1188.

Taylor, RL., Williams, DM., Craven, PC., Drutz, DJ., Magee, WE. 1982. Amphotericin B in liposomes : a novel therapy for histoplasmosis. Am. Rev. Respir. Dis. 125 : 610-611.

Theijls, H., Gnarpe. G. and Victor, A. 1991. Diagnostic and prevalence of persistent chlamydial infection in infertile women : tissue culture, direct antigen detection, and serology. Fertil. Steril. 55 : 304-310.

Thomas, N. S., Lusher, M., Storey, C. C., and Clarke, I. N. 1997. Plasmid diversity in Chlamydia. Microbiology. 143 : 1847-1854.

Tirrel, D. A., Heath, J. D., Colley, C.H. and Ryman, B. E. 1976. New aspects of liposomes. Biochim. Biophys. Acta. 457 : 259-302.

Tribby, I. I. E., Friis, R. R., and Moulder, J. W. 1973. Effect of chloramphenicol, rifampicin, and nalidixic acid on *Chlamydia psittaci* growing in L cells. J. Infec. Dis. 127 : 155-163.

Towbin, H., Staehlin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some explanations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 4350-4354.

Toye, B., Laferriere, C., Claman, P., Jessamine, P., Peeling, R. 1993. Association between antibody to the chlamydial heat shock protein and tubal infertility. *J. Infect. Dis.* 168 :1236-1240

Treharne, J. D., Yearsley, P. J. and Ballard, R. 1989. In vitro studies of *Chlamydia trachomatis* susceptibility and resistance to rifampin and rifabutin. *Antimicrob. Agents and Chemoth.* Aug. 1989. 33(8) :1393-1394.

Tremblay, C., Barza, M., Fiore, C., and Szoka, F. 1984. Efficacy of liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26 : 170-173.

Van Bogelen, R. A., Kelley, P. M., and Neidhardt, F. C. 1987. Differential induction of heat shock, SOS and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169 : 26-32.

van Eden, W., van der Zee, R., Alberta, G. A., Prakken, B. J., Wendling, U., and Wauben, M. H. M. 1998. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol. Today* 19 : 303-307.

Vanwaeyenbergh, J. 1993. Les infections à *Chlamydia trachomatis*. *Acta urologica Belgica.* 61 : 145-151.

Vemuri, S., and Rhodes, C.T. 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems : a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70 : 95-111.

Wagar, E. A., Schachter, J., Bavoil, P., Stephens, R. S. 1990. Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. J. Infect. Dis. 162 : 922-927.

Ward, M., Bailey, R., Lesley, A., Kajbaf, M., Robertson, J. and Mabey, D. 1990. Persisting inapparent chlamydial infection in a trachoma endemic community in the Gambia. Scand. J. Infect. Dis. 69 : 137-148.

Wasan, K. M., Lopez-Berestein, G. 1995. The past, present, and future uses of liposomes in treating infectious diseases. Immunopharmacology and immunotoxicology, 17(1), 1-15.

World Health Organization. Sexually transmitted diseases. Press release WHO/64, 25 August 1995.

Washington, A., Johnson, R. E., Sanders, L. Jr. 1987. *Chlamydia trachomatis* infection in the United States : what are they costing us ? JAMA. 257 : 2070-2072.

Weiss, E., and Dressler, H. R. 1960. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103 : 691.

ANNEXE

Calcul du Z pour le microscope HDM 002878

- Évaluer le diamètre du champ microscopique (d) pour un grossissement donné (400x), avec une lamelle microscopique

$$D = 0,45 \text{ mm}$$

- Calculer ensuite la surface Sc du champ microscopique ($Sc = \pi R^2$)

$$Sc = \pi R^2$$

$$Sc = 3,1416 \times (0,45\text{mm} / 2)^2$$

$$Sc = 3,1416 \times 0,050625$$

$$Sc = 0,1590435$$

- Mesurer la surface interne du puits (Sp) ou du tube pour avoir la surface totale infectée

Diamètre de la lamelle : 12 mm

$$Sp = \pi R^2$$

$$Sp = 3,1416 \times (12\text{mm} / 2)^2$$

$$Sp = 3,1416 \times 36$$

$$Sp = 113,0976$$

- Calculer enfin le nombre de champs microscopique de cette surface (Z)

$$Z = Sp / Sc$$

$$Z = 113,0976 / 0,1590435$$

$$Z = 711.111$$

Donc il y a 711 champs microscopiques pour un grossissement de 400X.