

Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
anti-LPS:	Anti-polyLiposaccharide
ARNr:	Acide Ribonucléique ribosomique
ARNr16S:	Acide Ribonucléique ribosomique 16S
ATP:	Adenosine triphosphate
CE:	Corps élémentaire
C-HSP 60:	Chlamydia trachomatis heat shot protein 60
CIQ :	Contrôle Interne de Qualité
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
COFRAC:	Comité Français d'Accréditation
CP:	Crossing point
CR:	Corps Réticulé
DE:	Diluant Echantillon
EEQ:	Evaluation Externe de Qualité
EIA:	Enzym Immuno Assay
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
FIV:	Fécondation in vitro
GAP:	Glyceraldéhyde-3-phosphate
GEU:	Grossesse extra-utérine
GM-CSF:	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.
gyrA:	gyrase A
gyrB:	gyrase B
HAS:	Haute Autorité de Santé
HLA:	Human Leukocyte Antigen
HPI:	Heures Post infection
HSP 60:	heat shot protein 60
HSP:	Heat Shock Protein
IAC:	Insémination Artificielle avec Sperme
IC:	Contrôle Interne
ICSI:	Intra Cytoplasmic Sperm Injection
ICT:	Test Immunochromatographique
IFD:	Immunofluorescence Directe
IgA:	Immunoglobuline A
IgG:	Immunoglobuline G
IL:	Interleukine
Ile:	Isoleucine
IFN- γ :	Interféron- γ
IST:	infection sexuellement transmissible
kDa:	Kilo Daltons
LAMP:	Lipid-Associated Membrane Proteins

LBM:	Laboratoire de Biologie Médicale
LCR :	Ligase Chain Reaction
Leu:	Leucine
LGV:	Lymphogranulomatose Vénérienne
LPS :	Lipopolysaccharide
MET:	Microscope Electronique à Transmission
Mgpa:	Mycoplasma Genitalium Protein Adhesion
Mgpar:	Mycoplasma Genitalium Protein Adhesion Repeats
mgpB:	Mycoplasma Genitalium Protein B
MLSK:	Macrolides Lincosamides Streptogramins Ketolides
MOMP:	Major Outer Membrane Protein
NatChla:	National Survey on Chlamydia Trachomatis Infection
NF-kB:	Nuclear Factor- Kappa B
OMS:	Organisation Mondiale de la Sante
ompA:	Outer Membrane Proteins A
PBS:	Tampon Phosphate
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pH:	Potentiel d'Hydrogène
PID:	Pelvic Inflammatory Disease
PMME:	Protéine Majeure de la membrane Externe
PPLO:	PériPneumonie-Like Organism
QRDR:	Quinolone Resistance Determining Region
SDA :	Strand Displacement Amplification
TAAN:	Test d'Amplification d'Acides Nucléiques
TLR:	Toll-Like réceptors
TMA:	Transcription Mediated Amplification
TR:	Tampon pour Resuspension
TTZ:	Triphenyl Tetrazolium
UNG:	Urétrite non gonococcique
VPP:	Valeur Prédictive Positive
VPN:	Valeur Prédictive Négative

Liste des tableaux

Tableau I: Pouvoir pathogène de <i>Chlamydia trachomatis</i>	22
Tableau II: Méthodes directes de mise en évidence de <i>Chlamydia trachomatis</i>	29
Tableau III: Importance de l'association des mycoplasmes urogénitaux, différents tableaux cliniques.	42
Tableau IV: Plan de la disposition des échantillons pour l'évaluation de la contamination	67
Tableau V: Disposition des puits sur les boîtes de tampon d'extraction et de lavage	74
Tableau VI: Résultats de la répétabilité des pooling endocervicaux	83
Tableau VII: Répétabilité des urines	85
Tableau VIII: Evaluation de la fidélité intermédiaire du pooling pv et d'un échantillon 1601126192PJ	87
Tableau IX: Variabilité inter-opérateurs	88
Tableau X: Récapitulatif de % de positifs des différents prélèvements	89
Tableau XI: Résumé des résultats du test AMPLIX comparés à ceux du test Cobas TaqMan CT, v2.0 sur des échantillons endocervicaux après résolution des faux négatifs.	91
Tableau XII: Résumé des résultats du test AMPLIX comparé à ceux du test Cobas TaqMan CT, v2.0 sur des échantillons d'urine et de sperme	92
Tableau XIII: Résultats sur la Justesse	92
Tableau XIV: Récapitulatifs des résultats positifs associés aux milieux de prélèvement	94

Liste des figures

Figure 1: Le diagramme montre les différences entre les nouveaux et les anciennes classifications de l'ordre Chlamydiales _____	6
Figure 2: Vue de corps d'inclusion montrant des corps élémentaires (CE) et réticulée (CR) _____	7
Figure 3: Paroi ou enveloppe cellulaire de chlamydia _____	8
Figure 4: Le cycle de vie de <i>Chlamydia</i> . _____	11
Figure 5: Physiopathologie de l'infection urogénitale féminine à <i>C. trachomatis</i> _____	14
Figure 6: <i>Mycoplasma genitalium</i> en microscopie électronique _____	36
Figure 7: La comparaison des emplacements des gènes homologues qui ont été mis en correspondance sur les deux chromosomes <i>M. genitalium</i> et <i>M. pneumoniae</i> _____	37
Figure 8: Aperçu des mécanismes pathogéniques de <i>M. genitalium</i> _____	41
Figure 9: Plan de travail pour la préparation des échantillons _____	62
Figure 10: Réactifs COBAS TaqMan™ CT v2.0 _____	63
Figure 11: Principe d'extraction de l'ADN _____	69
Figure 12: Principe du COBAS TaqMan _____	71
Figure 13: Présentation des éléments sur le support de paillasse _____	73
Figure 14: Disposition de la perceuse sur le puits A _____	75
Figure 15: Disposition de la perceuse sur les puits B _____	75
Figure 16: Extracteur automatique, le système informatique de pilotage (AMPLIX) et le thermocycleur _____	81
Figure 17: Analyseur COBAS® TaqMan® 48 _____	81

Sommaire

INTRODUCTION	1
PARTIE I:REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Chapitre 1: Généralités sur <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i>	4
A/- <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
1. Taxonomie	4
1.1. Historique	4
1.2. Classification de la bactérie	5
2. Caractère bactériologique	6
2.1. Morphologie	6
2.2. Structures antigéniques	8
2.3. Variabilité antigénique	9
3. Cycle de développement	10
4. Pathogénie	11
4.1. Habitat et Mode de transmission	11
4.2. Physiopathologie	12
4.3. Facteur de virulence	15
5. Manifestations cliniques	16
5.1. Les infections génitales basses	17
5.2. Les infections génitales hautes	17
5.3. La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)	20
5.4. La proctite	20
5.5. Syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter	20
5.6. Trachome	21
6. Épidémiologie	22
7. Diagnostic Biologique	24
7.1. Diagnostic direct	24
7.2. Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique	29
8. Traitement	31
8.1. Sensibilité et résistance naturelle	31
8.2. Résistance acquise	32
B/- <i>Mycoplasma genitalium</i>	33
1. Taxonomie des Mycoplasmes	33

1.1. Historique	33
1.2. Classification	35
2. Caractères Bactériologiques	35
2.1. Morphologie	35
2.2. Croissance	37
2.3. Métabolisme	38
2.4. Structure antigénique	38
3. Pathogénie	39
3.1. Habitat	39
3.2. Physiopathologie	39
4. Manifestations cliniques	42
4.1. Infections génitales chez les hommes	43
4.2. Infections gynécologiques	44
5. Epidemiologie	48
6. Diagnostic	49
7. Le portage asymptomatique	50
8. Sensibilité et Traitement antibiotique	51
8.1. Résistance intrinsèque	51
8.2. Antibiotiques actifs	51
8.3. La résistance acquise	52
Chapitre 2: Validation de méthode selon les normes du COFRAC	53
1. La Répétabilité	53
2. La Contamination	54
3. Comparaison des méthodes	54
4. La Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)	55
5. Interférences et spécificité analytique	55
6. La Justesse	55
PARTIE II: TRAVAIL EXPERIMENTAL	57
Chapitre 1: Justificatif, objectifs et cadre de l'étude	58
1. Justification de l'étude	58
2. Objectifs de l'étude	59
2.1. Objectif général	59
2.2. Objectifs spécifiques	59

3. Cadre de l'étude : LBM BIO 24	59
Chapitre 2: Méthodologie.	61
1. Matériel et Réactifs	61
1.1. AMPLIX	61
1.2. COBAS TAQMAN	62
2. Echantillons et mode de recueil	64
3. Méthode de validation de AMPLIX	65
3.1. La répétabilité	66
3.2. La reproductibilité	66
3.3. La contamination inter-Echantillon	66
3.4. La variabilité inter-opérateur	67
3.5. Comparaison des méthodes (<i>C. trachomatis</i>) : AMPLIX vs TAQMAN	67
3.6. Sensibilité, spécificité, fidélité et justesse	67
3.7. Effet de la matrice avec les échantillons de sperme	68
4. Documentation de l'existence de <i>M. genitalium</i>	68
5. Principes des méthodes	69
5.1. AMPLIX	69
5.2. COBAS TAQMAN	70
6. Prétraitement des échantillons	71
Chapitre 3: Résultats	82
1. Évaluation des performances de la technique AMPLIX	82
1.1. La répétabilité	82
1.2. La Reproductibilité	86
1.3. La justesse les interférences et la contamination	89
2. Comparaison de la méthode AMPLIX et Cobas TaqMan	89
3. Documentation de la présence de <i>M. genitalium</i> sur des échantillons urogénitaux.	93
3.1. Résultats de la détection de <i>M. genitalium</i> et <i>C. trachomatis</i>	93
3.2. Crossing Point et le nombre de cycles	94
3.3. Relation entre l'état de la flore vaginal, <i>M. genitalium</i> et <i>C. trachomatis</i>	95
DISCUSSION	96
CONCLUSION	102
PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS	105
REFERENCES	106

INTRODUCTION

Les Infections Sexuellement Transmissibles (IST) constituent un problème majeur de santé publique tant par leur fréquence que par leur morbidité avec environ 357 millions de cas chaque année (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/fr/, consulté le 16-07-2016)

Parmi les agents bactériens responsables des IST, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* occupent une place importante.

Sur le plan diagnostic, seul *N. gonorrhoeae* est cultivé sur milieu acellulaire tandis que *C. trachomatis* et *M. genitalium* exigent soit une culture cellulaire soit la biologie moléculaire. Les méthodes immuno-fluorescence directe (IFD), immuno-chromatographiques (ICT) et immuno-enzymatiques (EIA) ne sont plus recommandées pour le diagnostic direct de *C. trachomatis* (11).

La culture cellulaire pour *C. trachomatis* n'est pas recommandée pour le diagnostic du fait de sa sensibilité et de sa dépendance en quantité de corps élémentaires (CE) présents dans l'échantillon, cependant elle garde son importance pour l'isolement de la souche et les tests de sensibilité aux antibiotiques. Concernant *M. genitalium*, la culture cellulaire est fastidieuse et de mauvaise sensibilité.

Pour *C. trachomatis* et *M. genitalium*, la biologie moléculaire demeure donc la méthode recommandée pour le diagnostic en routine lorsque le laboratoire dispose d'un équipement de biologie moléculaire.

Dans les pays en développement l'utilisation de la biologie moléculaire comme outils de diagnostic reste encore limitée aux unités de recherche du fait des coûts liés aussi bien à l'équipement/maintenance et aux réactifs.

En Afrique de l'ouest et particulièrement au Sénégal, le diagnostic de routine de *C. trachomatis* est effectué dans la grande majorité des cas par des méthodes non recommandées telles que IFD, ICT et EIA et rarement par biologie moléculaire. Quant

à *M. genitalium*, la recherche de cet agent bactérien responsable d'IST n'est pas effectuée aussi bien dans les Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) que dans les unités de recherche.

Au LBM BIO24 le diagnostic de *C. trachomatis* par biologie moléculaire a été instauré en 1996. Dans le cadre de l'élargissement de son plateau technique et de sa contribution dans la lutte contre les IST, nous avons entrepris ce travail pour mettre en place un outil de diagnostic par biologie moléculaire (PCR multiplex) de *C. trachomatis* et de *M. genitalium* avec double objectif :

- Valider l'équipement AmpliX de BIOSYNEX pour le diagnostic moléculaire par PCR multiplex en temps réel de *C. trachomatis* et *M. genitalium*
- Documenter l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons ayant servi à la recherche de *C. trachomatis*

Ce travail sera structuré en deux parties :

- ✓ La première partie sera consacrée à la revue bibliographique sur *C. trachomatis* et *M. genitalium*
- ✓ La deuxième partie concernera notre travail expérimental où seront présentés le matériel, la méthodologie utilisée, puis les résultats obtenus qui seront alors discutés pour en tirer une conclusion et proposer des recommandations et des perspectives.

PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Généralités sur *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium*

A/- *Chlamydia trachomatis*

Les *chlamydiae* constituent un petit groupe de bactéries coccoïdes non mobiles qui sont des parasites intracellulaires obligatoires des cellules eucaryotes. La cellule bactérienne de *Chlamydia* est incapable de mener à bien le métabolisme énergétique et manque de nombreuses voies de biosynthèse ; elle est donc entièrement dépendante de la cellule hôte pour leur fournir de l'ATP et d'autres molécules intermédiaires. En raison de leur dépendance à l'égard des machines de biosynthèse de l'hôte, les *Chlamydiae* ont été initialement pensés pour être des virus ; cependant, ils ont une paroi cellulaire et contiennent l'ADN, l'ARN et les ribosomes, et par conséquent doivent être classés comme des protistes inférieurs ou procaryotes c'est-à-dire des bactéries (113).

1. Taxonomie

1.1. Historique (3)

En 1906, Haelberstaeder et Von Prowazek découvraient des inclusions dans les frottis conjonctivaux de trachomateux.

En 1964, Moulder montrait que ces micro-organismes sont des bactéries à développement intracellulaire. Elles ont été désignées tour à tour sous les noms de : *Bedsonia*, *Myagawanella*, *neorickettsie*.

L'ordre des *Chlamydiales* (du grec= petite casaque) comprenais la famille des *Chlamydiaceae*. Les *Chlamydiaceae* ont été séparées des rickettsies en 1970.

En 1989 les souches TWAR ont été désignées comme *C. pneumoniae* et, en 1992, *C. pecorum* a été individualisée.

1.2. Classification de la bactérie

Grâce à une application plus large des outils de la biologie moléculaire et à la découverte d'autres microorganismes appartenant à l'ordre des *Chlamydiales*, la classification au sein de cet ordre a subi, au cours des dernières années, des changements importants (35).

Aujourd'hui, on distingue 4 familles dans l'ordre des *Chlamydiales* à savoir:

- les *Simkaniaceae*.
- les *Parachlamydiaceae*.
- les *Walddliaceae*.
- les *Chlamydiaceae*.

La famille des *Chlamydiaceae* est aujourd'hui classifiée en 2 genres qui regroupent au total 9 espèces à savoir (35):

- le genre *Chlamydia* correspondant au groupe *trachomatis* (3 espèces).
- le genre *Chlamydophila* correspondant au groupe *psittaci* (6 espèces) (fig 1).

Ces 9 espèces sont classifiées sur la base des homologies de séquences :

- de l'opéron ribosomal ; dans l'étude des homologies interspécifiques de séquence de l'opéron ribosomal, des valeurs supérieures à 95% indiquent l'appartenance à un genre et des valeurs supérieures à 98% indiquent l'appartenance à une espèce.
- du gène codant la protéine majeure de la membrane externe ou Major Outer Membrane Protein (MOMP) (39).

Ces 9 espèces sont également classifiées selon d'autres critères comme :

- la production de glycogène en quantité détectable par la coloration du Lugol.
- la taille du génome.
- le nombre d'opérons ribosomaux par génome.

- les caractères bioécologiques tels que la spécificité d'hôte.

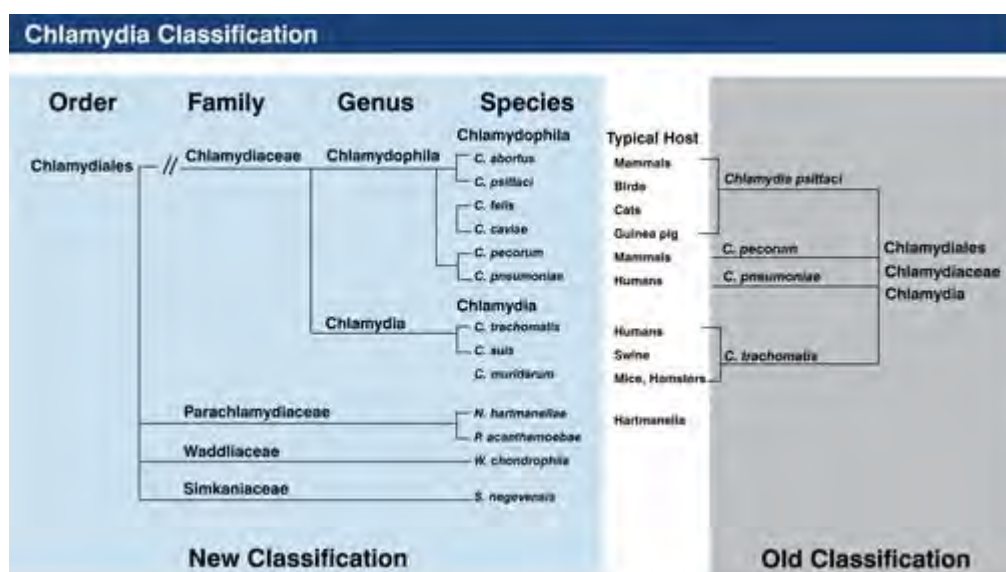


Figure 1: Le diagramme montre les différences entre les nouveaux et les anciennes classifications de l'ordre Chlamydiales (www2.idexx.com, consulté le 16-07-20016)

2. Caractère bactériologique

2.1. Morphologie

Ce sont des bactéries immobiles à Gram négatif. Elles possèdent une membrane externe contenant un lipopolysaccharide, un peptidoglycane mais sans acide muramique.

Les *chlamydiae* existent dans la nature sous deux formes : une forme non répliquative qui est une particule infectieuse appelée le corps élémentaire (CE) mesurant 0,25 à 0,3 μm de diamètre et une forme intra-cytoplasmique appelée le corps réticulé (CR), de 0,5 à 0,6 μm de diamètre. Le corps réticulé se livre à la répliquation et la croissance. La forme non répliquative est libérée par les cellules infectées rompues et peut être transmise d'un individu à l'autre (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*) ou par des oiseaux infectés à l'homme (*C. psittaci*) (Fig. 2) (112).

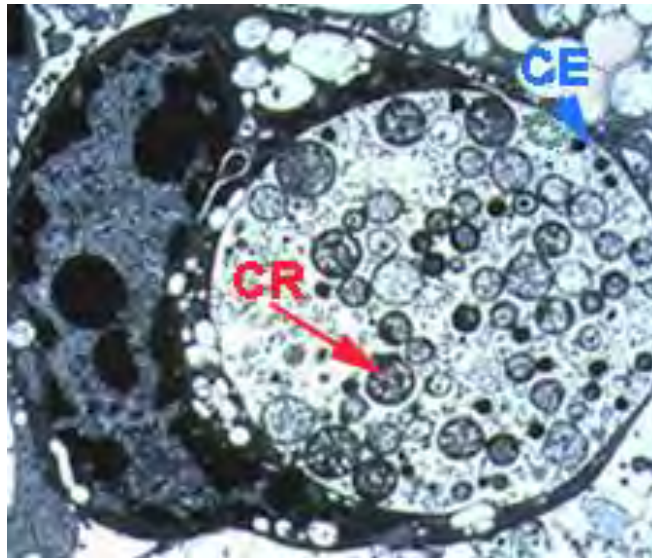


Figure 2: Vue de corps d'inclusion montrant des corps élémentaires (CE) et réticulée (CR)
(www.microbes-edu.org/etudiant/chlamydia.html; consulté le 05-08-2016)

Une partie du noyau (N) et les mitochondries (M) peuvent également être considérées **(112)**.

Les deux formes du cycle de vie possèdent une enveloppe de cellule qui se compose d'une membrane externe et une membrane interne avec un manque ou un déficient en peptidoglycane. **(Fig.3)**

En dépit de cette carence, les CE sont osmotiquement stables, bien que les CR soient facilement lysés par traitement ultrasonique. La principale protéine de la membrane externe (MOMP) du CE d'environ 40 kilodaltons (kDa) comprend au moins trois protéines riches en cystéine (un doublet de 60 kDa et un peptide de 12 kDa),¹¹ lesquelles sont largement réticulées de liaisons disulfures pour former un réseau supra macromoléculaire. En revanche, la membrane externe du CR est déficiente en protéines riches en cystéine, et la MOMP du CR n'est pas beaucoup réticulée **(52)**.

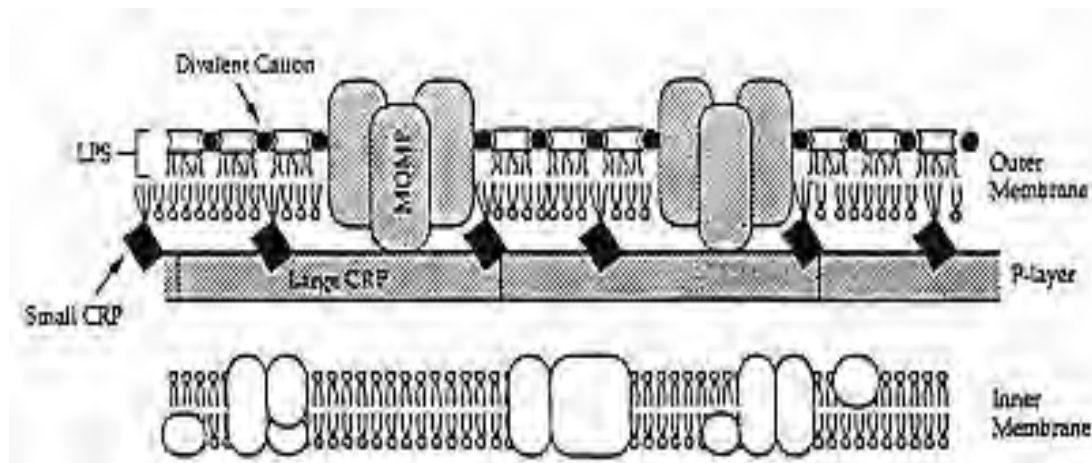


Figure 3: Paroi ou enveloppe cellulaire de chlamydia (52)

Le corps élémentaire, qui est couvert par une paroi cellulaire rigide, contient un génome d'ADN d'un poids moléculaire de 66×10^7 (environ 600 gènes). Un plasmide cryptique d'ADN (7,498 paires de bases) est également présent. Il contient un cadre de lecture ouvert d'un gène impliqué dans la réplication de l'ADN. En outre, le corps élémentaire contient une polymérase responsable de la transcription du génome de l'ADN après l'entrée dans le cytoplasme de la cellule hôte et l'ouverture du cycle de croissance de l'ARN. Tout au long du cycle de développement, le génome, les protéines et les ribosomes sont conservés dans la cellule procaryote membranaire (corps réticulé) (112).

2.2. Structures antigéniques (3)

La structure antigénique des *Chlamydia* est complexe et les antigènes ont des spécificités de genre, d'espèce et de type.

- un **antigène de genre** : il existe un lipopolysaccharide (LPS) commun aux trois espèces, présent dans la paroi externe et thermostable. Il possède des analogies avec celui de *Salmonella* ainsi que des réactions antigéniques croisées avec les formes *rough* (rugueuses).
- un **antigène spécifique d'espèces** : le plus important est la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) qui jouerait un rôle de porine. Elle permet de

différencier les espèces entre elles. Immunogène puissant, cette protéine est utilisée pour l'élaboration d'anticorps monoclonaux et constitue un candidat potentiel pour la préparation d'un vaccin.

- des **antigènes spécifiques de types** : ils permettent de différencier les 15 sérotypes de *C. trachomatis*, les multiples sérovars de *C. psittaci*, et les trois sérovars de *C. pecorum*. Jusqu'à présent, un seul sérovar de *C. pneumoniae* est connu.

Les anticorps dirigés contre ces différents antigènes sont décelables par réaction d'immunofluorescence indirecte, par technique ELISA ou par Western-blot. Ils n'ont guère de pouvoir protecteur.

2.3. Variabilité antigénique

La MOMP contribue à la rigidité du corps élémentaire et joue un rôle d'adhésion. Par ailleurs, sa position transmembranaire en forme de trimère lui permet de fonctionner comme une porine pour le corps réticulé une fois que les ponts disulfures sont rompus.

L'analyse comparative de l'ADN de gènes de MOMP de trois sérotypes différents de *C. trachomatis* a révélé que la MOMP a quatre régions de variabilité d'acides aminés intercalées entre les cinq régions de conservation d'acides aminés (93). **Baehr et al.** ont en outre suggéré que les quatre régions de variabilité ont été exposées à la surface et les cinq régions constantes étaient transmembranaires (47).

Trois des quatre régions variables ont été identifiées comme des sites antigéniques sur la surface de l'organisme entier, en utilisant des anticorps monoclonaux (47).

Le modèle d'organisation de la MOMP basé sur le profil hydrophobe des acides aminés déduits de la séquence nucléotidique prévoit l'exposition externe des quatre régions variables. En utilisant des techniques immunologiques, il a été démontré que la région variable I et la région variable II portent les déterminants antigéniques pour la formation d'anticorps spécifiques des sérotypes tandis que la région variable IV induit la formation d'anticorps spécifiques des sérogroupes et des espèces. Le séquençage de

ces régions a donc permis de définir de nouveaux sérovars. Ces nombreux types antigéniques favoriseraient les réinfections. L'existence de domaines variables de la protéine permettrait une variation antigénique, permettant à la bactérie de contourner la réponse immunitaire de l'hôte (23).

3. Cycle de développement

Dans les infections des voies génitales, *C. trachomatis* se réplique principalement dans l'épithélium de l'urètre de l'homme et dans l'endocol de la femme provoquant une inflammation, un œdème, et une décharge de la muqueuse.

Chlamydia affiche un cycle de développement biphasique (Fig. 4). Les corps élémentaires (CE) des bactéries adhèrent et envahissent des cellules hôtes épithéliales. Le compartiment phagocytaire naissant est rapidement modifié par les protéines dérivées de *Chlamydia* pour générer une vacuole parasitophore appelée inclusion. Dans l'inclusion, le CE se différencie en CR; la forme métaboliquement active et répliquative de l'agent pathogène. Les CR se divisent par fission binaire, l'inclusion se dilate et à mi-parcours le cycle infectieux commence à se différencier de nouveau de manière asynchrone dans la forme CE.

Les CE nouvellement formés sont finalement libérés par lyse et/ou extrusion cellulaire pour initier de nouveaux cycles infectieux (87).

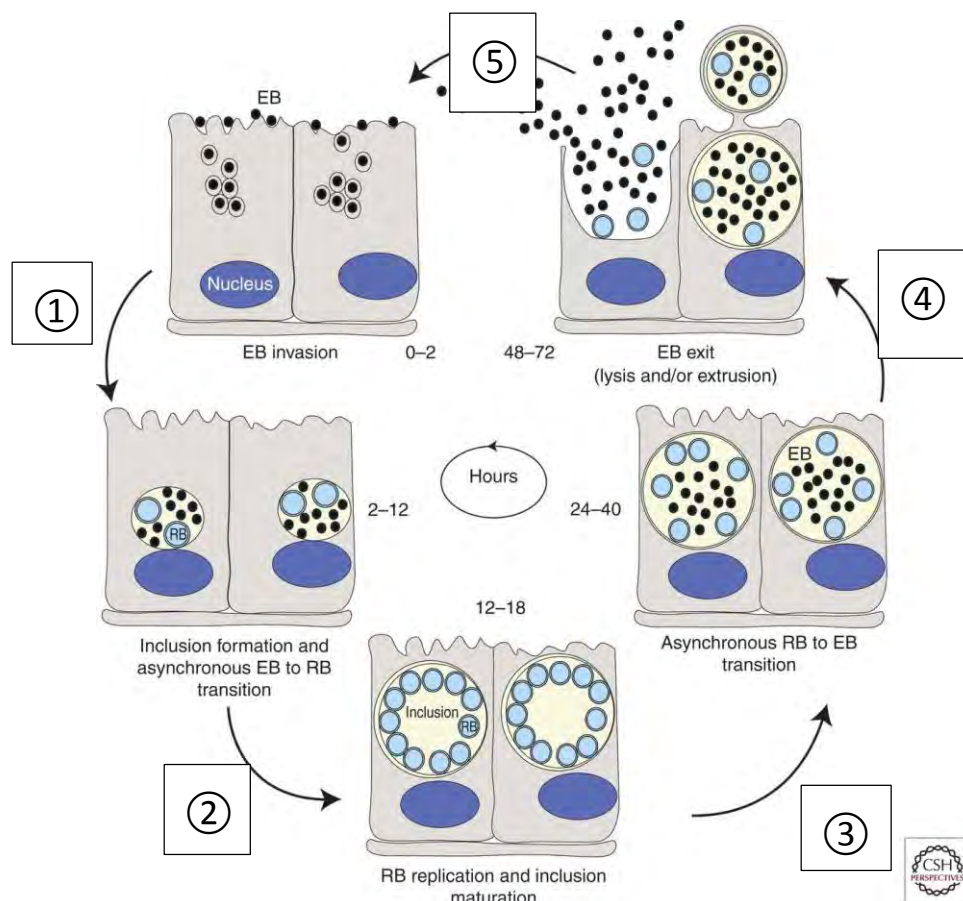


Figure 4: Le cycle de vie de *Chlamydia* (Hatch, 1999).

Dans les deux premières heures suivant l'internalisation dans les cellules, les corps élémentaires (CE) fusionnent pour former une inclusion naissante. Entre 2 et 6 h après internalisation, les CE commencent à se différencier dans les plans réticulaires (CR). En 12 heures post-infection (hpi), les CR peuvent être observés en division par fission binaire et de 18 -24 hpi ils augmentent en nombre. Un nombre croissant de CR différenciés retourne en CE environ 24 hpi et continuent jusqu'à ce que la lyse ou l'extrusion se produise à 48-72 hpi selon les espèces de *Chlamydia*.

4. Pathogénie

4.1. Habitat et Mode de transmission

C. trachomatis est un petit bacille, intracellulaire obligatoire, il ne peut survivre en dehors d'une cellule hôte. Sa survie dans les vacuoles cytoplasmiques de la cellule infectée est rendue possible grâce à sa capacité d'inhiber le complexe de fusion phagosome-lysosome.

C. trachomatis a pour hôte exclusif l'homme et la transmission se fait soit :

- ✓ Horizontalement : par les relations sexuelles, essentiellement ;
- ✓ Verticalement : cas du nouveau-né infecté par sa mère lors de l'accouchement (54);
- ✓ Auto-contamination des organes génitaux vers les yeux, par des mains souillées ;
- ✓ Contamination oculaire indirecte possible par les mouches se posant sur les yeux des nouveau-nés dans les pays à forte endémie.

4.2. Physiopathologie (51).

La multiplication intracellulaire représente un événement crucial dans la physiopathologie de l'infection. Au cours de l'infection, la réaction inflammatoire est suivie de l'apparition d'une réaction immunitaire humorale et cellulaire. Une activation du système immunitaire local et systémique aboutit à la synthèse des anticorps anti-*C. trachomatis* détectés dans les sécrétions locales et dans le sérum, mais c'est le système lymphocytaire qui joue le rôle le plus important. Ces réactions peuvent soit limiter, soit éradiquer une infection aiguë mais, dans certains cas, apparaît une infection chronique et persistante (70).

La persistance, définie comme une stase de l'infection durant laquelle la réponse immune de l'hôte n'a pas éliminé le pathogène, est responsable de la destruction tissulaire continue (16). Le phénomène de persistance, moyen de défense de l'hôte est non seulement insuffisant pour détruire la bactérie puisqu'il inhibe sa croissance sans l'altérer mais il déclenche une réaction inflammatoire évoluant pour son propre compte vers les complications redoutables. Ces complications surviennent après une longue persistance du micro-organisme ou plusieurs réinfections (44).

Les phagocytes non professionnels (cellules épithéliales) infectés par les *Chlamydia* produisent des substances pro- inflammatoires (cytokines, facteurs de croissance et autres médiateurs cellulaires). L'IFN- γ inhibe le pouvoir infectieux de certains sérovars (sérotypes) de *C. trachomatis* (78). La différence de sensibilité des sérovars de *C.*

trachomatis vis-à-vis de l'IFN- γ peut être à l'origine soit de l'éradication, soit de la persistance de l'infection **(78)**. L'IFN- γ peut contribuer à la pathogenèse des infections persistantes en prévenant l'apoptose des cellules infectées **84)**.

Une mauvaise régulation de l'apoptose et le phénomène de persistance offrent une alternative au pouvoir pathogène des *Chlamydia*. Sur le plan histopathologique, l'infection consiste en un infiltrat profus contenant des polymorphonucléaires neutrophiles, des lymphocytes, des cellules plasmatiques et des macrophages. Les follicules lymphoïdes développés contiennent au centre des lymphocytes B, des macrophages et à la périphérie des lymphocytes T. **(Fig.5)**.

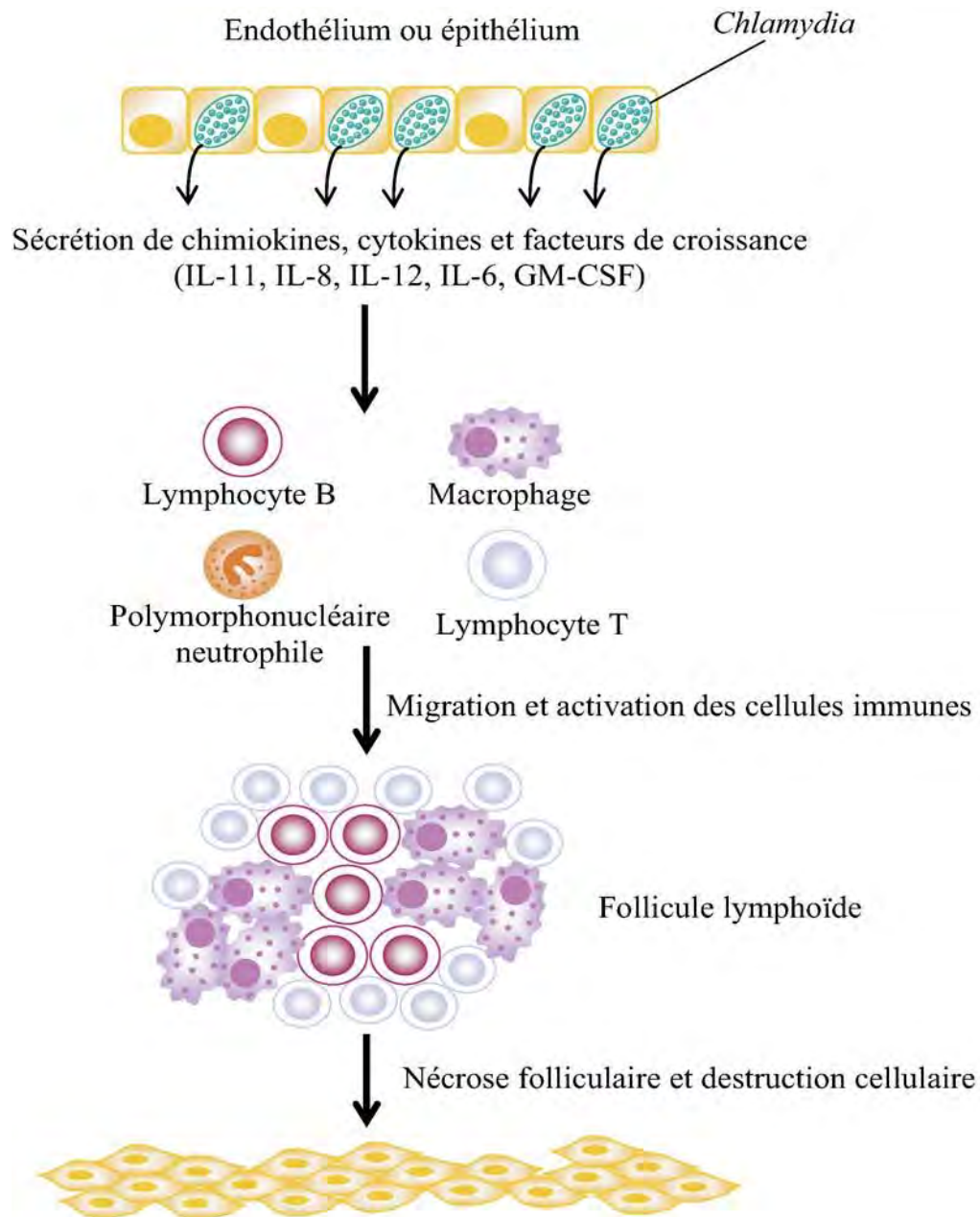


Figure 5: Physiopathologie de l'infection urogénitale féminine à *C. trachomatis*

IL: interleukine, GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.

(70).

4.3. Facteur de virulence

La colonisation de *Chlamydia* commence avec la fixation aux récepteurs d'acide sialique sur les yeux, la gorge ou les organes génitaux. Il persiste sur sites des corps qui sont inaccessibles aux phagocytes, les cellules T et les cellules B. Sur la base de la réactivité du sérum, *C. trachomatis* peut être divisé en au moins 19 sérotypes, dont D-K sont responsables de la maladie sexuellement transmissible (38). Ces sérotypes provoquent de grandes maladies chez l'homme :

- ✓ le trachome endémique (causées par les sérotypes A, B, Ba et C);
- ✓ les maladies sexuellement transmissibles et la conjonctivite à inclusions (causées par les sérotypes D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J et K);
- ✓ la lymphogranulomatose vénérienne (causées par les sérotypes L1, L2, L2a et L3).

Les facteurs qui leur permettent de pénétrer dans les cellules, de s'y multiplier et d'en sortir peuvent être considérés comme des facteurs de virulence (88).

En temps normal, la fusion des phagosomes et des lysosomes est due à une reconnaissance de membrane. Les lysosomes ne fusionnent qu'avec la membrane des phagosomes, mais pas avec la membrane plasmique, ou les autres structures membranaires dans le cytoplasme. Pour expliquer l'absence de fusion des lysosomes avec les phagosomes contenant les *Chlamydia*, on peut penser que soit les *Chlamydia* qui sécrètent quelque chose qui inhibe la fusion, ou soit au moment de l'attachement à la surface de la cellule les *Chlamydia* modifient la membrane du phagosome qui n'est plus reconnue par les lysosomes. C'est cette deuxième hypothèse qui est généralement retenue. Lorsque des *Chlamydia* inactivées par la chaleur ou enrobées d'anticorps sont phagocytées par des cellules, elles sont rapidement détruites car elles ne sont plus capables d'inhiber la fusion des lysosomes et des phagosomes (37).

Il semble donc qu'un facteur présent à la surface des CE, sensible à la chaleur, absent de la surface des CR soit capable d'inhiber la fusion des lysosomes et des phagosomes contenant les *Chlamydia*. Ce facteur, vraisemblablement, modifierait la membrane de

la vacuole au moment de la pénétration des *Chlamydia* dans la cellule-hôte car il n'y a pas de fusion (34).

Il semble que la pénétration des *Chlamydia* dans les cellules soit stimulée par la particule suivante le « zipper mechanism » de Silverstein (46), les récepteurs mis en jeu étant différents pour *C. trachomatis* sérotype A à K, LGV et *C psittaci* (88).

5. Manifestations cliniques (51)

Chez la femme, l'infection est localisée primitivement aux muqueuses génitales et évolue le plus souvent à bas bruit, à l'origine d'un portage asymptomatique, source, d'une part, de dissémination de l'infection, d'autre part, de complications telles que les infections hautes (Syndrome Inflammatoire Pelvien) et l'hypofertilité. L'infection génitale peut suivre deux voies :

- la voie urétrale provoquant une urétrite qui peut passer inaperçue ou produire un syndrome urétral (dysurie, pollakiurie, ténesmes vésicaux etc.) ;
- la voie génitale basse qui peut évoluer de façon ascendante.

Le col est la porte d'entrée habituelle. *C. trachomatis* peut être responsable de cervicite (principal vecteur de contamination), d'endométrite, d'inflammation pelvienne aiguë ou chronique. Les infections génitales récurrentes sont particulièrement associées à une augmentation du risque de l'inflammation pelvienne qui est d'autant plus redoutable qu'elle atteint la femme jeune. Elle évolue souvent à bas bruit et provoque des lésions tubaires irréversibles. L'infection est caractérisée par sa latence et sa persistance. La bactérie peut être bloquée par la réaction inflammatoire de l'organisme à l'état de corps réticulés altérés porteurs d'une protéine de choc thermique (Heat Shock Protein, HSP), protéine de la membrane externe, génératrice de réaction inflammatoire à long terme avec production continue de fibrine, altérant la muqueuse tubaire, obturant les trompes, entourant d'adhérences les trompes et les ovaires.

Les manifestations peuvent, également, être mineures, voire inexistantes.

5.1. Les infections génitales basses

5.1.1. Cervicites

C. trachomatis a une affinité particulière pour l'épithélium cylindrique (endocol et endomètre).

Les cervicites à *C. trachomatis* sont caractérisées par une réaction inflammatoire plus ou moins intense, s'accompagnant de sécrétions purulentes. Le col utérin est enflammé et saigne facilement au toucher vaginal. Des follicules lymphoïdes, analogues à ceux du trachome peuvent être observés. Les cervicites persistantes à *Chlamydia* sont communes chez les femmes en pleine activité sexuelle et constituent un véritable réservoir de germes.).

5.1.2. Urétrites

La place prépondérante de *C. trachomatis* dans l'urétrite non gonococcique chez l'homme est bien connue. Chez les femmes présentant dysurie, pollakiurie, leucocyturie avec une bactériologie standard négative, la responsabilité de *C. trachomatis* a été mise en évidence (79).

5.2. Les infections génitales hautes

5.2.1. L'endométrite

Il s'agit de la propagation ascendante, à travers le canal endocervical, d'une infection située au niveau de l'urètre ou au niveau du col. Elle est caractérisée par une infiltration lympho-plasmocytaire diffuse du stroma et quelque fois de micro-ulcérations. C'est à partir de cette localisation que surviennent les complications (81).

5.2.2. Les salpingites

La conséquence la plus sévère est la salpingite qui peut être soit aiguë, soit chronique et infra-clinique. Le rôle de *C. trachomatis* dans la pathologie tubaire n'est plus à démontrer et c'est ce qui fait sa gravité (41). *C. trachomatis* est responsable de la moitié

des cas de salpingite aiguë, et peut être retrouvée dans toutes les formes cliniques graves (abcès, pelvipéritonites) mais, la salpingite à *Chlamydia* est volontiers subaiguë avec moins de fièvre et de douleurs que les salpingites gonococciques.

Le signe clinique le plus constant reste la douleur mais elle est d'intensité variable, parfois il s'agit d'une simple gêne pelvienne. Elle est associée dans 30 à 50 % des cas à des métrorragies. La fièvre est absente une fois sur deux. Les leucorrhées ne sont pas toujours retrouvées.

À la coelioscopie, l'aspect est très évocateur quand il montre des adhérences visqueuses avec pseudo-kystes péritonéaux à contenu gélatineux (55). La coelioscopie est également le moyen de faire des prélèvements in situ qui permettront d'affirmer le diagnostic, d'envisager le pronostic, et de commencer le traitement en réalisant une toilette péritonéale.

Le spectre clinique des inflammations pelviennes va d'une endométrite asymptomatique à une salpingite sévère, pyosalpinx, péritonite pelvienne et péri-hépatite. La preuve de la responsabilité de *C. trachomatis* dans les stérilités tubaires est, aujourd'hui, bien établie. Elle a été faite par des études sérologiques et par culture par de nombreux auteurs (63, 76, 86). Le rôle de *C. trachomatis* dans la grossesse extra-utérine a également été démontré (2, 62, 26).

5.2.3. Syndrome de Fitz-Hugh-Curtis

Syndrome qui associe salpingite aiguë et péri-hépatite, il est caractérisé par l'association de fièvre, de douleurs de l'hypocondre droit et du pelvis. Parfois dominé par le syndrome hépatique, le diagnostic peut conduire en erreur.

5.2.4. Complications materno-fœtales

5.2.4.1 Complications au cours de la grossesse.

L'augmentation des endométrites du post-partum chez des femmes qui présentaient une infection à *C. trachomatis* diagnostiquée en début de grossesse a été démontrée (104). Cette infection pourrait être alors à l'origine d'une stérilité secondaire.

Au cours des années 1970, il a été révélé que l'infection intra-utérine à *C. trachomatis* pouvait se produire lors d'une rupture prématurée des membranes (75). Puis dans les années 1980, il a été montré que *C. trachomatis* était responsable d'un certain nombre d'avortements tardifs et de morts in utero (66).

5.2.4.2 Conséquences de l'infection chez l'enfant.

Les nouveau-nés sont infectés lors du passage dans la filière génitale (114).

C'est le mode de contamination le plus connu. Les complications les plus fréquentes et les mieux connues sont les conjonctivites et les pneumonies (67, 56). *C. trachomatis* est capable de provoquer d'autres infections telles que des otites moyennes, des obstructions nasales et des bronchiolites.

Le nouveau-né peut présenter une conjonctivite à inclusions qui survient dans un délai de 5 à 14 jours après la naissance. Cette localisation habituellement bénigne peut laisser des séquelles cornéennes.

La période d'incubation de la pneumonie à *C. trachomatis* varie de 15 jours à 15 semaines.

L'infection se traduit par une toux sèche survenant par quintes, parfois cyanosante souvent accompagnée de dyspnée dans un syndrome infectieux important. Lorsqu'elle est associée à une rhinorrhée ou surtout à une conjonctivite, elle est très évocatrice.

5.3. La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)

Infection sexuellement transmissible, décrite pour la première fois par Hunter en 1786, puis en 1833 par Wallace (29). Son entité pathologique n'a été établie qu'en 1913 par Nicolas, Favre et Durand sous le terme de bubon climatérique.

Relativement fréquente dans les pays tropicaux et subtropicaux, elle peut s'observer dans les pays tempérés, où il s'agit le plus souvent d'importation d'un pays endémique ou d'un contact avec des sujets venant d'un pays endémique.

La LGV ou maladie de Nicolas-Favre est due aux sérovars L1, L2, L2a, et L3 de *C. trachomatis* qui possèdent un tropisme ganglionnaire et réticulo-endothélial. Ces sérovars sont différents des autres sérovars, par leur tendance à généraliser l'infection.

La tranche d'âge présentant le plus de risque se situe entre 20 et 40 ans.

Les lésions primaires génitales ou anales sont ulcérées et transitoires. La LGV peut se compliquer de lymphadénite, rectite, fistule et évoluer vers la chronicité.

5.4. La proctite

Elle peut être due aux sérovars D à K ou L1 à L3. La proctite due aux sérovars D à K est asymptomatique ou peu symptomatique alors que celle due aux sérovars L1 à L3 est généralement plus grave.

5.5. Syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter

Dans 70 à 80 % des cas, l'antigène HLA B 27 objective un terrain prédisposant. Les patients possédant cet antigène sont plus susceptibles de développer le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter (69). Ce syndrome oculo-uréthro-synovial est un rhumatisme inflammatoire aigu ou subaigu associé à une atteinte uréthrale et conjonctivale. *C. trachomatis* est un des agents de ce syndrome chez l'homme.

5.6. Trachome

Le trachome, une infection à *C. trachomatis* des cellules épithéliales de la conjonctive, entraîne une infiltration sous-épithéliale de lymphocytes, conduisant au développement des follicules. Les cellules épithéliales infectées contiennent des corps d'inclusion cytoplasmiques. À la suite de dommages aux cellules épithéliales, les fibroblastes et les vaisseaux sanguins envahissent la zone infectée, ce qui forme un pannus, et la cornée devient vascularisée et assombrie. Les paupières deviennent balafrées et malformées, ce qui provoque le trichiasis, une croissance intérieure anormale des cils. Le grattage continu de la cornée par les cils conduit à opacification de la cornée et la cécité.

C. trachomatis provoque également l'inclusion conjonctivite, une maladie des yeux des enfants et des adultes qui est moins sévère que le trachome. Il se compose de conjonctivite purulente qui guérit spontanément sans laisser de cicatrices.

Le Tableau I résume les principales manifestations cliniques de *C. trachomatis* (Barbeyrac B et al., 2000).

Tableau I: Pouvoir pathogène de *Chlamydia trachomatis*

Sérovars	Infections aiguës	Complications/infections chroniques
A→C	Kérato-conjonctivite	Trachome cicatriciel, cécité
D→K	Infections sexuellement transmissibles <ul style="list-style-type: none"> Chez la femme <ul style="list-style-type: none"> – cervicite – urétrite Chez l’homme <ul style="list-style-type: none"> – urétrite Dans les deux sexes <ul style="list-style-type: none"> – conjonctivites Nouveau-nés <ul style="list-style-type: none"> – conjonctivite – pneumopathie 	Endométrite, salpingite, GEU, Infertilité tubaire, syndrome de Fitz-Hugh-Curtis Épididymite, prostatite, hypofertilité Syndrome de Reiter, arthrite réactionnelle
L1 → L3	Lymphogranulomatose vénérienne	Trouble de drainage lymphatique

6. Épidémiologie

L'infection à *C. trachomatis* est la plus fréquente des Infection Sexuellement Transmissibles (IST) bactériennes en Europe et aux États-Unis **(30)**. Le nombre de cas enregistrés à Bruxelles est passé de 304 cas en 2002 à 1164 cas en 2013, ce qui correspond à une augmentation de l'incidence rapportée de 31,1/100 000 habitants en 2002 à 99,1/100 000 habitants en 2013

(www.wiv-isp.be/News/Documents/Rapport_IST_2013.pdf, consulté le 26-07-2016).

Le trachome est répandu en Afrique et en Asie (plus de 500 millions de personnes

estimées), et des cas sporadiques se produisent partout dans le monde. La maladie se développe dans les zones chaudes et sèches où il y a une pénurie d'eau et où les normes d'hygiène sont faibles (112). L'agent est répandu aux yeux par les mouches, les serviettes sales, les doigts ou les crayons cosmétiques pour les yeux (112). *C. trachomatis* est capable d'infecter à la fois les yeux et les voies urogénitales. Les campagnes de lutte contre le trachome impliquant uniquement des traitements anti-oculaires sont futiles.

C. psittaci, la cause de la psittacose chez les oiseaux et parfois chez l'homme, est transporté par les oiseaux sauvages et domestiques, y compris la volaille. La gravité de la psittacose chez l'homme a été considérablement réduite par la sensibilité de *C. psittaci* aux antibiotiques.

C. pneumoniae se propage dans les populations humaines par des infections des voies respiratoires. Il est l'agent de la pneumonie atypique chez les patients hospitalisés ainsi que chez les jeunes individus atteints d'une maladie respiratoire aiguë. Il a provoqué des épidémies en Scandinavie. Les études de la prévalence des anticorps à *C. pneumoniae* chez les humains à travers le monde ont montré qu'il prévaut également au Japon, au Panama et en Amérique du Nord (112).

En Europe, le taux d'infections à *C. trachomatis* en 2009 était plus élevé chez la femme (592,2/100 000) que chez l'homme (219,3/100 000) (<http://www.avert.org/std-statistics-america.html> consulté le 18-11-2015).

En France, les résultats de l'enquête NatChla montrent que la prévalence chez les personnes âgées de 18 à 44 ans est de 1,4 % chez l'homme et de 1,6 % chez la femme. Elle est plus élevée chez les 18–29 ans (hommes : 2,5 % [IC 95 % : 1,2–5,0], femmes : 3,2 % [IC95 % : 2,0–5,3]) (43).

Des études effectuées sur des femmes à faible risque dans différents pays d'Afrique ont fait apparaître une prévalence des infections à *Chlamydia trachomatis* comprise entre 0,6 % chez les femmes venant en consultation prénatale en Tunisie à 5,5 % dans la population féminine générale en Gambie et 19,7 % chez les femmes venant en consultation prénatale au Nigéria (estimation globale des IST). Une étude réalisée dans

la population masculine générale dans quatre villes d'Afrique subsaharienne a montré des taux de prévalence des infections à *C. trachomatis* allant de 2,1 % à 2,6 % à Ndola, Cotonou et Kisumu jusqu'à 5,9 % à Yaoundé

(apps.who.int/iris/bitstream/10665/90797/1/9789242504477_fre.pdf, consulté le 26-07-2016).

7. Diagnostic Biologique (51)

L'isolement de la bactérie par culture cellulaire est la technique la plus spécifique. Cependant, elle reste très spécialisée, longue et coûteuse. Des tests rapides de diagnostic direct comme l'immunofluorescence directe, les techniques immuno-enzymatiques et apparentées ont été développés et appliqués à la détection des antigènes de la bactérie. Les techniques de détection des acides nucléiques et en particulier les techniques d'amplification génique apportent une contribution nouvelle au diagnostic de ces infections (**Tableau II**).

La sérologie est un témoin plus tardif de l'infection et se positive significativement lorsque les voies génitales hautes sont contaminées.

7.1. Diagnostic direct

Le diagnostic direct est relativement facile lors des infections génitales basses localisées, mais devient plus délicat au cours des infections hautes en raison de la difficulté de recueil de prélèvements.

7.1.1. Prélèvements

Les procédés diagnostiques les plus modernes restent tributaires de la qualité des prélèvements. Étant donné le caractère intracellulaire des *Chlamydia*, les prélèvements doivent contenir des cellules quelle que soit la technique de diagnostic utilisée.

7.1.2. Conditions de prélèvement

Les milieux et les conditions de transport des prélèvements sont adaptés à la technique de détection utilisée par le laboratoire.

Seule la culture cellulaire exige des conditions strictes de transport, de délai et de température, de manière à ne pas affecter la viabilité de la bactérie (CE).

Pour les prélèvements réalisés par écouvillonnage, le choix des écouvillons utilisés est important. Ils doivent être adaptés au recueil des cellules et ne doivent pas être toxiques pour la culture cellulaire.

Les prélèvements destinés à la culture sont impérativement et immédiatement placés à +4 °C. Le temps de conservation doit être inférieur à 48 heures. Sinon, ils doivent être congelés à -70 °C avant l'inoculation en sachant que la congélation entraîne une perte d'au moins 20 % de la viabilité des bactéries (72).

7.1.3. Méthodes directes de détection de *C. trachomatis*

7.1.3.1 La culture cellulaire

L'intérêt de la culture cellulaire est l'isolement des souches permettant une étude épidémiologique (sérotypage ou génotypage) et éventuellement une étude de la sensibilité aux antibiotiques en cas d'échec thérapeutique. Dans ce contexte, la culture cellulaire constitue la seule méthode diagnostique valable. La sensibilité de cette méthode dépend du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon et de leur état répliatif, fonction du stade de la maladie aiguë ou chronique (50). La présence d'une forme persistante de *C. trachomatis* échappe complètement à l'isolement en culture cellulaire (7).

7.1.3.2 Tests de diagnostic rapides.

Les techniques de détection des antigènes structuraux de la bactérie (lipopolysaccharide : LPS, et protéine majeure de la membrane externe : PMME OU MOMP) sont apparues au début des années 1980 et ont rencontré un grand succès dû à leur moindre coût, leur facilité d'utilisation et à la rapidité des résultats.

L'immunofluorescence directe (IFD) permet la détection d'antigènes spécifiques du genre *Chlamydia* ou de l'espèce *C. trachomatis* sur frottis.

L'utilisation des anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine révèle des CE extracellulaires, exceptionnellement des inclusions, sur un tapis de cellules épithéliales, témoin de la qualité du prélèvement.

La spécificité est meilleure avec les anticorps monoclonaux anti-PMME qu'avec les anti-LPS spécifiques de genre **(98, 99, 108)**. La sensibilité est estimée à 80–90 % et la spécificité à 98–99 % par rapport à la culture, lorsque les deux méthodes sont réalisées de façon optimale **(12)**.

L'avantage de cette technique est sa simplicité et sa rapidité (résultat en moins d'une heure). Elle est destinée à la recherche de *C. trachomatis* dans les prélèvements urétraux, endo-cervicaux et conjonctivaux, mais peut être appliquée à des prélèvements divers (liquides péritonéaux et biopsies de trompe et d'endomètre). L'IFD permet de détecter les *Chlamydia* viables ou non, l'inconvénient majeur étant la subjectivité de la lecture. Cette lecture dépend de la qualité du microscope à fluorescence et de l'expérience du microscopiste.

L'IFD est une méthode très sensible et constitue une bonne technique de diagnostic des infections aiguës et des infections asymptomatiques dans les populations à forte prévalence **(49)**, cependant, elle est d'un intérêt moindre au cours des infections chroniques ou persistantes **(50)**.

Grâce à sa grande spécificité, l'IFD est utilisée comme test de confirmation des techniques de diagnostic direct non fondées sur la culture.

Les techniques immuno-enzymatiques (EIA) et apparentées ont été développées pour la détection d'antigènes de *Chlamydia* extraits de prélèvements urogénitaux et fournissent une alternative à la culture. La cible antigénique est généralement le LPS car il est plus soluble que la PMME.

L'avantage des méthodes EIA et apparentées est leur réalisation rapide et simple avec possibilité d'automatisation qui permet de faire de grandes séries. Les tests unitaires

sur membrane (immuno-chromatographie) ne nécessitent aucun équipement et ont été largement utilisés.

Toutes ces méthodes nécessitent une moins grande expérience du personnel et permettent la détection de *Chlamydia* viables ou non (moins de précaution à prendre au niveau du transport des prélèvements). La plupart de ces méthodes n'ont été validées que pour les prélèvements endocervicaux et les prélèvements urétraux.

L'inconvénient majeur est leur faible sensibilité (50 à 60 %) notamment lorsque le prélèvement contient peu de bactéries et lors d'infection persistante.

7.1.3.3 Techniques de biologie moléculaire.

Au début des années 1990, les techniques de biologie moléculaires ont été développées et utilisées dans la recherche.

La détection de *C. trachomatis* par des sondes ADN est réalisée par hybridation in situ ou en milieu liquide (15, 49).

L'hybridation in situ avec des sondes nucléiques spécifiques a permis d'observer la persistance de *C. trachomatis* dans les trompes de femmes souffrant de stérilité tubaire alors que la culture était négative (15). L'hybridation moléculaire en milieu liquide n'apporte pas un gain de sensibilité par rapport aux techniques EIA (50).

Les techniques d'amplification sont des méthodes très sensibles (PCR, LCR...) (86 à 96 %) puisqu'elles amplifient un petit nombre d'acides nucléiques présents dans le prélèvement. La spécificité (supérieure à 99,5 %) est assurée par le choix des amorces et par la méthode de révélation. Ces techniques d'amplification, en multipliant le nombre de copies de la séquence cible si elle est présente dans l'échantillon étudié, ont pour effet d'en améliorer considérablement le seuil de détection. Elles sont capables de détecter une molécule cible.

Les techniques de biologie moléculaire avec amplification génique, pallient les insuffisances de la culture en cas de mauvais transport, d'antibiothérapie ou de

prélèvements cytotoxiques (urines, liquides de ponction etc.) absence ou rareté de CE.

Les techniques qui amplifient l'ARNr possèdent une plus grande sensibilité que les tests d'amplification qui détectent le plasmide ou le gène de la MOMP. Cependant, l'ARNr est plus fragile que l'ADN ce qui peut affecter la sensibilité des tests **(50)**.

Le développement de la PCR en temps réel permet de quantifier les produits d'amplification **(85)**.

L'avantage de la PCR quantitative (application pour les virus : charge virale que pour les bactéries) est sa rapidité et sa capacité de produire des résultats quantitatifs. Ce sont des techniques qui ont un avenir prometteur pour le diagnostic rapide et la compréhension de la physiopathologie des infections à *Chlamydia*.

Tableau II: Méthodes directes de mise en évidence de *Chlamydia trachomatis*

Cibles	Techniques
Bactérie vivante (CE infectieux)	Culture cellulaire
Antigènes :	
<ul style="list-style-type: none"> • LPS, PMME 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunofluorescence directe (IFD) • Techniques immuno-enzymatiques et apparentées
Acides nucléiques :	
<ul style="list-style-type: none"> • ARNr • ADN chromosomique (gène <i>omp1</i>) • ADN plasmidique 	<ul style="list-style-type: none"> • Hybridation moléculaire • Amplification (TMA) • Amplification (PCR) • Amplification (PCR, LCR, SDA)

LPS : lipopolysaccharide; PMME : protéine majeure de la membrane externe;

TMA : transcription mediated amplification ; PCR : polymerase chain reaction ; LCR : ligase chain reaction; SDA : strand displacement amplification.

7.2. Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique

La recherche des anticorps anti-*Chlamydia* n'a pas la même valeur diagnostique que la mise en évidence du microorganisme.

Chez les patients atteints de la lymphogranulomatose vénérienne, la clinique associée aux tests sérologiques permet le plus souvent de poser le diagnostic étiologique. Les tests sérologiques sont fortement positifs avec une ascension rapide du titre des anticorps **98, 12**). Les techniques de diagnostic actuellement utilisées sont la micro-immunofluorescence (MIF) et les techniques immuno-enzymatiques.

Ces techniques apportent des arguments diagnostiques indirects mais sont d'interprétation délicate en raison de la persistance des anticorps des mois, voire des

années après l'infection. Il peut être difficile de préciser l'espèce en cause et de distinguer une cicatrice sérologique d'une infection en évolution. Actuellement, des réactifs spécifiques de l'espèce *C. trachomatis* sont disponibles et améliorent l'interprétation.

La spécificité des anticorps varie au cours de l'évolution de la maladie. Les anticorps anti-LPS apparaissent durant la phase aiguë de l'infection et sont suivis des anticorps spécifiques d'espèce.

Au cours des infections génitales hautes (salpingite aiguë, péri-hépatite), des taux élevés d'anticorps sont souvent retrouvés.

Les IgA ont une demi-vie courte et leur détection serait en faveur d'une infection en évolution. Pour le moment, aucun consensus n'est établi quant à leur intérêt.

Le dosage systématique des IgG et des IgA permet classiquement de distinguer les infections anciennes avec persistance des anticorps des infections actives où les IgG et les IgA spécifiques ont des taux élevés.

Une autre protéine de la membrane externe de *C. trachomatis*, la C-HSP 60 peut induire une réponse immune de type hypersensibilité retardée. L'organisme infecté développe une réponse immune humorale vis-à-vis de la HSP 60 et plusieurs études ont montré une association importante entre la présence des anticorps anti-HSP 60 et le développement de séquelles chroniques inflammatoires (90, 91).

8. Traitement (5)

8.1. Sensibilité et résistance naturelle

Étant donné le cycle de développement particulier de *Chlamydia*, les antibiotiques susceptibles d'avoir une activité doivent traverser plusieurs membranes : celle de la cellule hôte, celle de la vacuole, et celle de la bactérie. Peu d'antibiotiques sont naturellement actifs sur *Chlamydia*. Parmi les antibiotiques potentiellement actifs, on trouve dans un ordre d'activité décroissante in vitro :

- les macrolides avec l'azythromycine ;
- la rifampicine qui possède les CMI les plus basses ;
- les tétracyclines notamment la minocycline et la doxycycline ;
- les fluoroquinolones les plus récentes (sparfloxacin) ;
- les fluoroquinolones moins récentes (ofloxacin, ciprofloxacine).

En revanche, les *Chlamydia* présentent une résistance naturelle :

- aux aminosides ;
- à la vancomycine ;
- aux quinolones de 1^{ère} génération ;
- au métronidazole ;
- à la colimycine.

Parmi les β -lactamines, seule la pénicilline G et l'amoxicilline présentent une certaine activité qualifiée de paradoxale puisque la bactérie est dépourvue de peptidoglycane. L'analyse du génome de *Chlamydia trachomatis* révèle la présence de tous les gènes nécessaires à la synthèse du peptidoglycane. L'hypothèse avancée est que du peptidoglycane serait synthétisé transitoirement au cours de la différenciation du CR en CE. Ceci explique l'action de la pénicilline G qui en empêchant cette différenciation, entraîne la formation de formes morphologiquement anormales, non cultivables.

8.2. Résistance acquise

Les résistances acquises sous traitement sont exceptionnelles et seulement trois publications en font état. L'une observe une moindre sensibilité à l'erythromycine et les deux autres une résistance aux tétracyclines mais seulement exprimée par une faible partie de la population bactérienne (1%), nommé résistance hétérotypique.

In vitro, il a été possible de sélectionner des souches résistantes par passages répétés en présence d'antibiotiques. C'est ainsi que des mutants à haut niveau de résistance ont été sélectionnés avec :

- la rifampicine.
- les sulfamides.
- le triméthoprim.
- l'ofloxacine et la sparfloxacine.

B/-Mycoplasma genitalium

Selon l'OMS, on estime à 448 millions de nouveaux cas d'infections sexuellement transmissibles (IST) qui sont acquis dans le monde entier chaque année **(110)**. Si elle est diagnostiquée à temps, ces infections peuvent être traitées facilement avec un minimum de morbidité ainsi qu'une diminution de la charge économique.

Mycoplasma genitalium est une cause émergente des IST et a été impliquée dans les infections urogénitales des hommes et des femmes du monde entier. Plus de 25 ans après son isolement initial chez des hommes atteints d'urétrite non gonococcique (UNG), *M. genitalium* est maintenant reconnu comme un agent étiologique important des UNG aiguë et persistante masculines et est responsable d'environ 20-35% des cas non Chlamydia de UNG. Le rôle de cet organisme dans les maladies génito-urinaire masculin fut un progrès important dans notre connaissance des IST, mais son rôle dans les maladies inflammatoires de l'appareil génital de la femme est toujours pas très clair **(95)**.

M. genitalium a été isolé par la culture dans les échantillons de l'urètre de deux hommes atteints d'urétrite non gonococcique (UNG) en 1981 **(101)**. Depuis lors, il est avéré très difficile d'isoler une souche de *M. genitalium* par techniques classiques de culture en raison de la nature de cette bactérie.

1. Taxonomie

1.1. Historique

Au début, tous les membres de la classe des Mollicutes étaient généralement nommés « mycoplasmes » ou « PériPneumonie-Like Organisme » (PPLO) pour les anglophones, puis on a découvert de nouvelles bactéries appartenant aux Mollicutes, autres que celles du genre *Mycoplasma*.

- En 1898, une première espèce de *Mycoplasma*/Mollicutes est isolée et cultivée par Nocard et Roux **(54)**.
- En 1956 D.G. Edward et E. A. Freundt font une première proposition pour la

classification, avec la désignation PPLO, mais ils sont encore indécis sur l'appartenance aux procaryotes (en 1956, dites «schizomycètes ») ou aux eucaryotes. Comme nom d'espèce de la PPLOs/mycoplasmes Edward et Freundt ont proposé *Mycoplasma mycoides*, reconnu comme responsable de la péripneumonie bovine et réfèrent cette bactérie à des organismes causant des maladies péripneumonie-like. Jusqu'alors, *Mycoplasma mycoides mycoides* était connu sous le nom *Asterococcus* qui sera ensuite invalidé.

- En 1956, Edward et Freundt décrivent 15 espèces de *Mycoplasma* dans une publication **(32)**.
- En mi-1967, le sous-comité sur la taxinomie de *Mycoplasmataceae* propose la création d'une classe des Mollicutes, contenant l'ordre Mycoplasmatales **33)**
- À la fin des années 1980, la phylogenie de l'espèce se précise **(106)**.

Désormais, le nom *Mycoplasma* doit être utilisé exclusivement pour les membres du genre *Mycoplasma*, et non pour désigner n'importe quelles Mollicutes. Comme ce ne fut pas le cas dans la littérature pendant une longue période, des confusions peuvent persister.

1.2. Classification

La classe Mollicutes contient six genres (*Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* et *Ureaplasma*), avec des distinctions génériques reposant principalement sur la morphologie, les différences dans la taille du génome, et certains besoins nutritionnels (106).

L'ordre des Mycoplasmatales comprend une seule famille ; celle des *Mycoplasmataceae*.

Cette famille est caractérisée par son exigence en stérol. Elle est constituée de deux genres : *Mycoplasma* et *Ureaplasma*.

Le genre *Mycoplasma* est constitué de 100 espèces dont 13 espèces humaines.

Le genre *Ureaplasma* est constitué de 6 espèces dont une seule est pathogène pour l'homme : *Ureaplasma urealyticum*. Sa localisation principale est urogénitale.

2. Caractères Bactériologiques

2.1. Morphologie

Les mycoplasmes sont pleiomorphes (formes rondes, ovoïdes, filamenteuses ou en chapelet), sensibles aux agents physiques (forces osmotiques, pH, agents tensioactifs, température) mais résistent bien à la congélation à -70°C. Ils sont faiblement colorés par le Giemsa et peuvent être observés en contraste de phase ou au microscope électronique (3).

M. genitalium est un mycoplasme mobile en forme de flacon avec une structure de terminale en pointe (tip) qui aide dans l'attachement à diverses surfaces et fournit une motilité glissante (Fig.6). Il n'a pas de peptidoglycane et, par conséquent, n'a pas de marqueurs de surface cellulaire. L'absence d'une paroi cellulaire signifie également que cette bactérie possède moins de stabilité osmotique dans le milieu d'accueil. L'absence de la paroi cellulaire est responsable d'une réaction de coloration de Gram négatif et d'une non-sensibilité aux β -lactamines qui inhibent la synthèse bactérienne de la paroi

cellulaire. Comme *M. genitalium* est trop petite pour être simplement visible sous un microscope optique, la première étude détaillée de sa structure a été réalisée sous un microscope électronique à transmission (MET) (95).

Avec 578 kb, il est le plus petit chromosome d'un organisme d'auto-replication (71) et peut être proche de la taille du génome minimal théorique nécessaire pour une entité cellulaire. (77).

Par la morphologie, la physiologie, la sérologie et les critères génétiques, il a été établi que *M. genitalium* est phylogénétiquement plus étroitement liée à *M. pneumoniae* que toutes les autres espèces. Pourtant, à plus de 800 kb, le chromosome de *M. pneumoniae* est environ 220 kb plus grand. Voir **Fig.7**.

En 1995 la séquence complète du génome de *M. genitalium* a été publiée en faisant d'elle la 2^{ème} bactérie après *Haemophilus influenzae* à avoir pleinement son génome séquencé. Bien que la plupart des génomes des mycoplasmes aient une faible teneur en (G+C), avec une gamme de 24-33% G+C, le génome de *M. genitalium* a relativement une forte teneur en G+C de 32% (95).

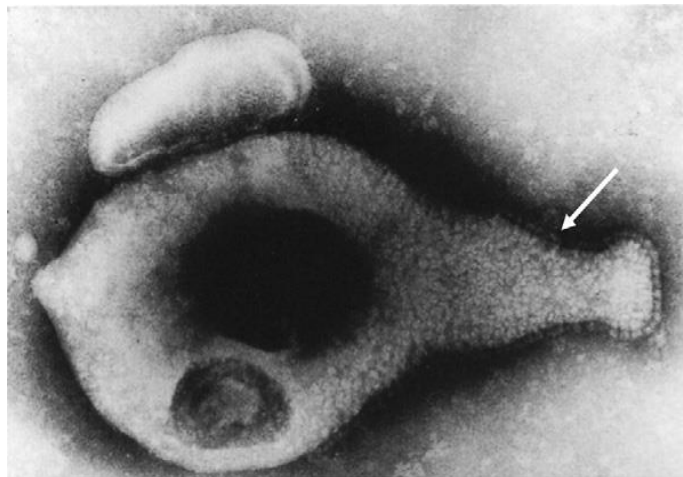


Figure 6: *Mycoplasma genitalium* en microscopie électronique

L'organelle d'adhésion ou tip est indiqué par une flèche (grossissement $\times 120\ 000$, réimpression de Tully et al. (101))

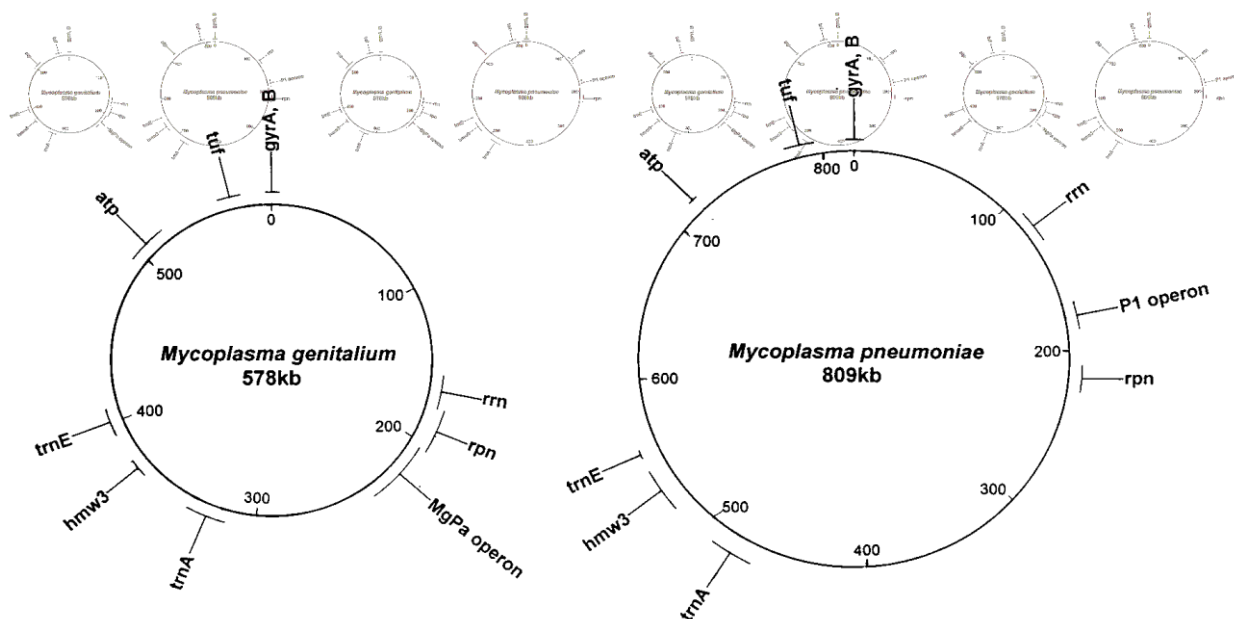


Figure 7: La comparaison des emplacements des gènes homologues qui ont été mis en correspondance sur les deux chromosomes *M. genitalium* et *M. pneumoniae* (Peterson S.N et al., 1995)

2.2. Croissance (3)

Les mycoplasmes se multiplient par division binaire sans qu'il y ait synchronisation entre la réplication du génome et la séparation des cellules : il se forme des filaments qui se divisent par étranglement en forme coccoïde.

Le temps de génération varie d'une heure (mycoplasmes génitaux) à 6 h (*M. pneumoniae*) et plus encore pour *M. genitalium*.

Sur milieu solide les colonies apparaissent en 48h (mycoplasmes génitaux) 5 jours (*M. pneumoniae*) ou 3 semaines (*M. genitalium*). La plupart des mycoplasmes forment des colonies en œuf sur le plat (le centre de la colonie pénètre dans la gélose) mais *M.pneumoniae* forme des colonies muri-formes. Ces colonies minuscules ont un diamètre de 100 à 400 μm ; *U.urealyticum* forme de petites colonies en oursin de 20 à 80 μm de diamètre.

2.3. Métabolisme (3).

Les mycoplasmes sont en général anaérobies facultatifs. Ils tirent leur énergie de la fermentation du glucose (*M. pneumoniae*, *M. fermentans*) ou de la dégradation de l'arginine en ornithine (*M. hominis* et *M. fermentans*) ou de l'hydrolyse de l'urée (*U. urealyticum*).

Ils cultivent en atmosphère micro-aerophile sauf *M. pneumoniae* et *M. genitalium* qui nécessitent une anaérobiose. Dans tous les cas le CO₂ favorise la croissance.

Les mycoplasmes exigent des milieux riches avec de l'extrait de levure et du sérum, ce dernier apporte le cholestérol nécessaire à la croissance.

Il existe très peu de caractères biochimiques permettant de différencier les souches de mycoplasmes : *M. pneumoniae* réduit le Triphenyl Tetrazolium (TTZ) et produit une hémolysine qui agit sur les hématies de cobaye. Les mycoplasmes sont résistant naturellement aux antibiotiques qui inhibent la synthèse du peptidoglycane (β -lactamines, cycloserine...).

2.4. Structure antigénique (3)

D'après la structure antigénique, on a distingué au sein des mycoplasmes 4 groupes :

- *M. pneumoniae* et *M. genitalium*,
- *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. ovale*,
- *M. fermentans*
- *U. urealyticum*.

La connaissance de la structure antigénique des mycoplasmes a un triple intérêt :

- pour l'identification par inhibition de croissance et par inhibition métabolique,
- dans la perspective d'un diagnostic direct par recherche d'antigène directement dans les produits pathologiques (*M. pneumoniae*),
- pour les sérodiagnostics.

Les mycoplasmes sont de petites bactéries (0,2-0,3 μ m). En microscopie électronique, *M. genitalium* est en forme de ballon et présente un organe d'adhésion, y compris au

moins sept adhésines. Il dispose également d'une motilité de glisse (97).

M. genitalium a un faible pourcentage de guanine plus cytosine à 32%. Il a été l'un des premiers génomes bactériens pour être totalement séquencés en 1995. Son génome est le plus petit de Mollicutes entièrement séquencé. Il est composé de 580 kpb avec 485 gènes. *M. genitalium* illustre le concept de «cellule minimale» (97). En dépit de cette faible taille, soit 4% du génome est constitué d'éléments répétés appelés Mgpar, pour «répétitions» mgPa, présentant une homologie avec le gène DGPM, codant pour la protéine immunodominante mgPa qui est la principale protéine d'adhérence *M. genitalium* (97).

3. Pathogénie

3.1. Habitat

Chez l'homme, les mycoplasmes et ureaplasmes peuvent être isolés des tractus urogénitaux et respiratoires. Ce sont des bactéries intra et extracellulaires. Ils s'adhèrent fortement aux cellules et peuvent bien vivre en extra-cellulaire.

3.2. Physiopathologie (98, 101)

Le principal mécanisme de la pathogenèse de *M. genitalium* est l'adhésion, un processus complexe impliquant plusieurs protéines et permettant à la bactérie d'adhérer à divers matériaux et cellules, y compris les cellules épithéliales (**Fig.8**). La principale adhésine de *M. genitalium* est le 140-kDa MgPa, codée par le gène mgpB. Il est au cœur de la réponse immunitaire de l'hôte. Les variations de séquences de gènes mgpB ont été décrites et sont probablement responsables de stratégies d'évasion immunologiques et la persistance de *M. genitalium*. La recombinaison homologue de portions de ce gène avec des éléments répétés du génome, MgPar, est le mécanisme responsable de ces variations antigéniques.

M. genitalium adhère très rapidement à la surface des cellules épithéliales génitales, aidé par sa "pointe" (tip). Il a été rapporté que *M. genitalium* adhère 2 h après l'infection. À 3 h, l'adhésion est suivie par l'invasion des bactéries internalisées dans

les cellules. *M. genitalium* est donc une bactérie intracellulaire et extracellulaire, situé dans le noyau où il se trouve dans la cellule.

Même si la phagocytose par les macrophages élimine efficacement les mycoplasmes, la localisation intracellulaire dans les cellules épithéliales pourrait permettre à *M. genitalium* de survivre en échappant à la réponse immunitaire et aux antibiotiques, la promotion de l'évolution de l'infection à la chronicité. L'infection induit une réponse immunitaire innée surtout médiée par des protéines lipidiques associées à la membrane (lipid-associated membrane proteins /LAMP), les lipoprotéines exprimées à la surface des cellules des mycoplasmes. Ces lipoprotéines, en interagissant avec ou des récepteurs TLR «Toll-like», jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse inflammatoire, ce qui induit l'activation de la voie NF-kB. Les auteurs d'une étude in vitro ont montré que LAMP dérivé de *M. genitalium* activé NF-kB par TLR1, TLR2 et TLR6, ce qui permet le recrutement et l'activation des monocytes et des macrophages dans les muqueuses cervicales et vaginales.

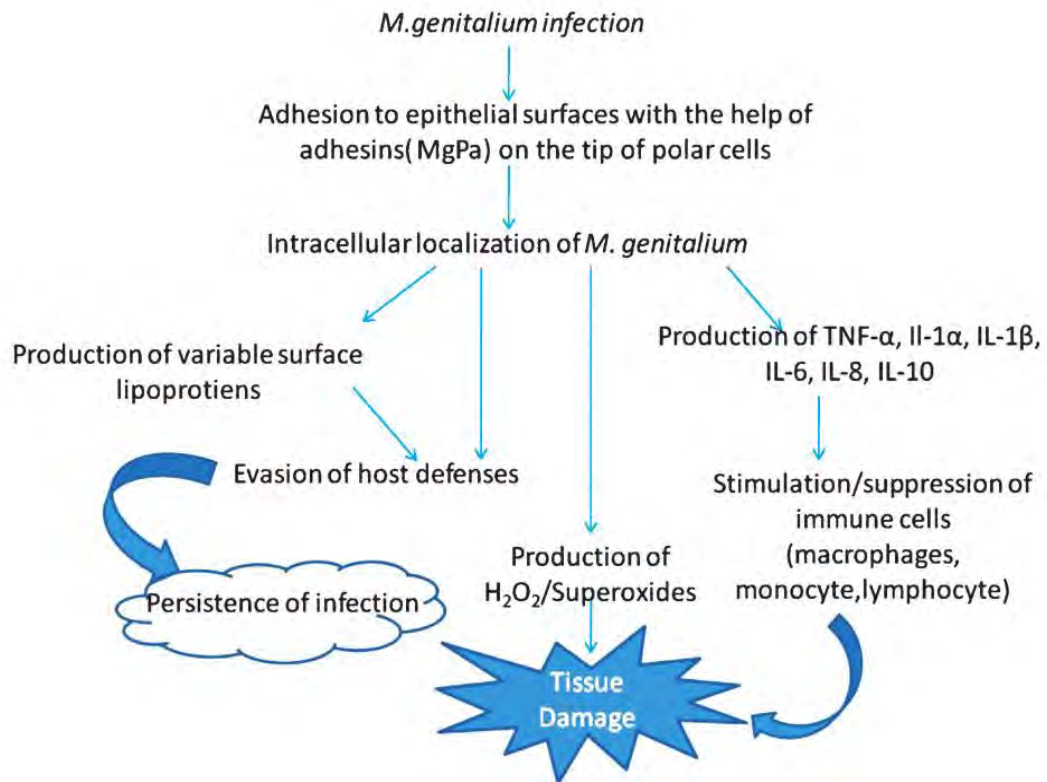


Figure 8: Aperçu des mécanismes pathogéniques de *M. genitalium* (Sunil sethi, 2012)

4. Manifestations cliniques (101, 14)

Les modifications de postulats (critères épidémiologiques, réponse immunitaire, réponse au traitement, pathogénicité expérimentale) de Koch ont été suggérées pour *M. genitalium* et ce mycoplasme semble répondre à ces critères modifiés. L'importance de l'association de *M. genitalium* avec différentes présentations cliniques est listée dans le **tableau III** et comparé aux autres mycoplasmes uro-génitaux.

Tableau III: Importance de l'association des mycoplasmes urogénitaux, différents tableaux cliniques (Tully,1983).

Maladies	<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma spp.</i>
Infections génitales chez les hommes			
UNG aiguë	+	—	+
UNG chronique	+	—	±
Urétrite post-gonococcique	+	—	—
Balanoposthitis	±	—	—
Épididymite, prostatite	±	—	±
Infections gynécologiques			
Vaginose bactérienne	±	+	±
Cervicite	+	—	—
Urétrite	+	—	+
Endométriose	+	+	—
Salpingite	+	+	—
Troubles liés à la grossesse			
Chorioamniotite	?	±	+
Fièvre post-partum	?	+	+
Grossesse extra-utérine	?	—	—
Avortement spontané	?	±	±
accouchement prématuré	?	—	+
Stérilité tubulaire	±	—	±
Infections néonatales	?	+	+
Infections extragénitales			
L'arthrite septique	+	+	+
L'arthrite réactive	+	—	+
Autres localisations	?	+	+

+: Relation prouvée ou causée; ±: relation non prouvée; - : Pas de relation documentée ; ?: non déterminé; UNG: urétrite non gonococcique.

4.1. Infections génitales chez les hommes

4.1.1. Urétrite non gonococcique(UNG) aiguë

M. genitalium est une cause bien connue des IST chez les hommes, la plupart du temps des UNG aiguë. Les premières études cliniques, en utilisant la PCR comme méthode de diagnostic, remontent à 1993. Les études qui ont suivi, ont permis de déterminer que *M. genitalium* a été le plus souvent associé à des symptômes d'une urétrite asymptomatique.

34 études, publiées (99, 74) entre 1993 et 2010, dont au moins 10 patients masculins présentant des UNG, et l'aide d'un procédé d'amplification d'acide nucléique pour évaluer la présence de *M. genitalium*. Ces études ont été menées en Europe, Amérique, Afrique, Asie et Océanie, dans les pays développés pour 28, et dans les pays en développement pour les six autres. Sur 6732 hommes présentant UNG aiguë, 834 (12%) avaient une PCR positive pour *M. genitalium*. Vingt-trois études cas-témoins d'UNG menées dans les pays en développement. Dans toutes les études *M. genitalium* a été trouvé le plus souvent chez les hommes présentant une UNG que chez les hommes sans urétrite, avec une différence statistiquement significative dans 18 études sur 23. *M. genitalium* est probablement responsable de 15 à 20% des cas UNG et est la deuxième cause la plus fréquente d'UNG après *C. trachomatis*.

La présence de symptômes semble corrélée à la charge bactérienne déterminée par PCR en temps réel. Yoshida *et al.* (113) ont rapporté que les patients se présentant avec une UNG avaient une charge significativement plus élevée de *M. genitalium* dans l'urine que les patients atteints d'urétrite gonococcique, ou chez les patients asymptomatiques. De même, les patients présentant des UNG non-*Chlamydia* avaient une charge bactérienne *M. genitalium* plus élevé que les patients asymptomatiques.

4.1.2. Urétrite non gonococcique chronique

M. genitalium est également associée à l'urétrite chronique. L'urétrite chronique est définie par la persistance ou la réapparition des symptômes de 30 à 90 jours après le traitement. La présence prolongée de *M. genitalium* dans l'urètre, malgré un traitement antibiotique, pourrait être la cause d'UNG persistante. La prévalence de *M. genitalium* a été estimée entre 12 et 41% chez les hommes présentant une urétrite persistante ou récurrente (99, 74).

4.1.3. Urétrite post-gonococcique

Une co-infection par *M. genitalium* est associée à un risque beaucoup plus élevé pour une urétrite post-gonococcique, c'est pourquoi il est recommandé de traiter l'urétrite gonococcique empiriquement par des antibiotiques efficaces contre *C. trachomatis* et *M. genitalium*.

4.1.4. Balanoposthite

En une seule étude, les auteurs ont rapporté que *M. genitalium* a été également associée à une balanite et/ou une posthite chez les patients présentant une UNG, contrairement aux patients présentant une urétrite causée par *C. trachomatis* ou *Ureaplasma spp.*

4.1.5. Prostatite et épididymite

La participation de *M. genitalium* dans ces infections reste à prouver. Très peu d'auteurs ont signalé la présence de *M. genitalium* dans des biopsies de la prostate ou dans le liquide épидидymal.

4.2. Infections gynécologiques

Le rôle des mycoplasmes dans les infections gynécologiques n'est pas bien documenté, même si les premières études de l'isolement sur PCR de *M. genitalium* dans le tractus urogénital féminin ont été publiées il y a longtemps. Bien que le nombre d'études sur le rôle pathogène de *M. genitalium* chez les femmes soient moins nombreuses que celles des hommes, *M. genitalium* semble être impliqué dans les infections des voies

génitales à divers niveaux.

4.2.1. Cervicite et urétrite

M. genitalium a été impliquée dans la cervicite. Manhart et al. (73) ont rapporté dans une étude rétrospective, que les femmes présentant une cervicite muco-purulente étaient 3,1 fois plus susceptibles d'être infectées par *M. genitalium* que les femmes sans cervicite. *M. genitalium* pourrait être le seul mycoplasme humain impliqué dans la genèse de la cervicite muco-purulente et urétrite féminine.

La cervicite est pauci-symptomatique rendant son diagnostic difficile. Falk et al. (36) ont rapporté qu'il n'y avait aucune différence dans les symptômes et les signes cliniques entre les infections à *C. trachomatis* et *M. genitalium*. Cependant, les signes cliniques d'une cervicite (leucorrhée, pus au col, des saignements lors de l'écouvillonnage du col de l'utérus, et l'aspect inflammatoire du col de l'utérus) semblent être en corrélation avec l'infection à *M. genitalium*, en particulier en Afrique. Dans huit des 14 études menées (57) (57%), une association significative a été trouvée entre *M. genitalium* et la cervicite. Cependant, ces études n'ont pas utilisé les mêmes critères pour définir la cervicite et sont donc difficiles à comparer ; ceux qui utilisent seulement des critères de diagnostic clinique l'association de *M. genitalium* avec cervicite était moins fréquente. *M. genitalium* peut provoquer une cervicite, en particulier en l'absence d'une infection due à d'autres bactéries responsables des IST. Cependant, cette association n'est pas compatible entre les études et d'autres études avec des critères de définition normalisés pour la cervicite sont nécessaires. *M. genitalium* peut également provoquer une urétrite féminine qui peut être difficile d'être différencier cliniquement d'une cervicite.

4.2.2. Infections génitales hautes

La maladie inflammatoire pelvienne (Pelvic inflammatory disease PID) est une affection grave du tractus génital supérieur (infection de l'utérus, les trompes de Fallope et les ovaires). Il existe différentes formes cliniques aiguës, comme l'endométrite ou salpingite. La PID est le plus souvent la conséquence d'infections polymicrobienne. *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* sont impliqués dans la PID dans un tiers de la moitié des cas, et plus de 70% des PID n'ont pas d'étiologie infectieuse identifiée. Depuis que *M. genitalium* est associée à une cervicite, il est raisonnable de penser qu'il peut aussi causer PID.

L'implication de *M. genitalium* a été soupçonnée pendant une longue période dans la PID. *M. genitalium* a été associé à une PID non chlamydia et non gonococcique. Il a été isolé chez 15% des patients présentant des PID, dans l'étude de PEACH (48). Neuf études ont cherché à déterminer la relation entre *M. genitalium* et la PID, soit directement par dépistage pour la bactérie en utilisant la PCR, ou en effectuant un diagnostic sérologique indirect. Une association statistiquement significative entre *M. genitalium* et la PID a été signalé dans sept des neuf études, dont cinq ont utilisé sur la PCR comme outil de diagnostic.

Dans le tractus génital supérieur, *M. genitalium* a été impliquée d'abord dans l'endométrite. Une étude a été réalisée au Kenya (24) sur 115 femmes ayant consulté dans un centre de dépistage des IST en raison de la douleur pelvienne aiguë. Cinquante-huit cas d'endométrite ont été diagnostiqués et *M. genitalium* a été détecté dans les prélèvements endocervicaux ou sur des biopsies de l'endomètre dans 16% des cas, comparativement à 2% pour les femmes sans endométrite ($P = 0,02$).

Les auteurs d'autres études ont rapporté une relation probable entre *M. genitalium* et une salpingite.

Une autre étude a été réalisée au Kenya (25) parmi les 123 femmes présentant une salpingite aiguë, confirmée par la laparoscopie, au cours de laquelle *M. genitalium* a été détecté dans le col de l'utérus et de l'endomètre, mais seulement une fois dans les

trompes de Fallope. Les femmes infectées par *M. genitalium* étaient plus souvent séropositifs. Les symptômes de la salpingite liée à *M. genitalium* sont plus souvent bénigne, comme celles dues à *C. trachomatis*, et moins sévère que la salpingite due à *N. gonorrhoeae*. Enfin, la prévalence de *M. genitalium* dans PID semble inférieure à celle de *C. trachomatis*. Son implication dans PID est probable néanmoins réelle et ne doit pas être sous-estimée, en particulier pour la gestion thérapeutique. Les données épidémiologiques supplémentaires sont nécessaires.

4.2.3. Conséquences obstétricales

La PID peut avoir des séquelles telles que la stérilité tubulaire et la grossesse extra-utérine. Il existe peu de données publiées sur la participation des infections de *M. genitalium* dans les manifestations obstétricales indésirables telles qu'une grossesse extra-utérine, une fausse couche, un avortement ou un accouchement prématuré. Peu d'études ont été entreprises sur l'infection par *M. genitalium* chez les femmes enceintes. La prévalence de *M. genitalium* chez la femme enceinte est comprise entre 0,7% à 8,7%.

M. genitalium ne semble pas être lié à la grossesse extra-utérine, selon les auteurs d'une étude (64) rétrospective suédoise, ni à une fausse couche. Les données sur l'implication de *M. genitalium* dans un accouchement prématuré ne sont pas compatibles. Dans une seule étude, les auteurs ont rapporté une relation statistiquement significative entre la présence de *M. genitalium* dans le col de l'utérus et d'accouchement prématuré alors que les auteurs d'autres études ne prouvent pas cette relation. Contrairement à d'autres mycoplasmes génito-urinaires, *M. genitalium* ne semble pas avoir des conséquences néfastes pour la santé des nouveau-nés de mères infectées. Toutefois, cela ne devrait pas être exclu, compte tenu de la similitude entre le rôle pathogène de *M. genitalium* chez les nouveau-nés et celle de *C. trachomatis*.

En dépit d'une insuffisance générale d'informations sur cette question, *M. genitalium* peut causer l'infertilité féminine, et l'infertilité en particulier tubaire. Les auteurs de deux études (20) danoises ont trouvé une relation significative entre la présence d'anticorps anti-*M. genitalium* et une infertilité tubulaire confirmée par la laparoscopie.

Svenstrup *et al.* (96) dans leur étude, ont indiqué que le dépistage endocervical de *M. genitalium* par PCR était négative, ce qui suggère qu'une infection antérieure pourrait plus probablement être la cause de lésions tubulaires.

4.2.4. D'autres localisations

M. genitalium a été impliquée dans des présentations de cas d'arthrite, en particulier dans le cas du syndrome de Reiter chez un homme de 25 ans, et l'autre au cours d'une exacerbation de l'arthrite chez un homme de 58 ans qui avait, depuis sa jeunesse, une polyarthrite juvénile séronégative en qui *M. genitalium* a été isolé à partir du liquide articulaire dans le genou. L'implication de *M. genitalium* dans l'arthrite réactive a été suggérée par des études de laboratoire. *M. genitalium* a été isolé à partir du sang, dans des expériences sur des modèles animaux. Ce pouvoir propagation hématogène pourrait expliquer certains cas d'arthrite réactive et la détection de l'ADN de *M. genitalium* dans le liquide articulaire de patients présentant une arthrite (1, 60).

5. Epidémiologie (83).

Au cours de la dernière décennie, *M. genitalium* a été identifié comme une cause relativement fréquente de l'urétrite non gonococcique, tant dans les pays industrialisés et dans les pays en développement. Des enquêtes pour définir sa pathogénicité chez les femmes ont donné des résultats quelque peu contradictoires. *M. genitalium* a été trouvé plus fréquemment chez les femmes japonaises, américaines et femmes avec une cervicite que chez les témoins, mais aucune association n'a été trouvée en France. Chez les femmes du Kenya, l'infection à *M. genitalium* a été associée à l'endométrite aiguë, mais sa prévalence est faible chez les femmes avec une salpingite. *M. genitalium* a été récupéré plus fréquemment dans les échantillons provenant de femmes britanniques avec une maladie inflammatoire pelvienne que chez les témoins. En Guinée-Bissau, l'infection à *M. genitalium* n'a pas été associée à des résultats défavorables de la grossesse.

Pour identifier la contribution de *M. genitalium* à l'étiologie de la cervicite chez les

prostituées en Afrique sub-saharienne et de son importance relative dans la charge globale des infections sexuellement transmissibles (IST), Pépin et al ont cherché *M. genitalium* dans les échantillons cervicaux des femmes au cours des études transversales chez les travailleuses du sexe au Ghana et au Bénin (83).

6. Diagnostic (1, 14)

La détection microbiologique est principalement réalisée par amplification des acides nucléiques ou PCR. La culture est extrêmement difficile et pas systématiquement réalisée. Les tests sérologiques sont faiblement sensibles et spécifiques. Dans le cas de l'urétrite, un échantillon d'urine de premier jet semble être plus facile pour la détection de *M. genitalium* chez les patients de sexe masculin que l'écouvillonnage urétral que chez des patients de sexe. Chez les femmes, l'écouvillonnage vaginal a été utilisé dans plusieurs études de prévalence sur la cervicite. Cette technique est plus facile à réaliser que l'échantillonnage endocervical; il est bien accepté et a une bonne sensibilité parce qu'il recueille des squames de cellules cervicales. Sa sensibilité, supérieure à la première miction échantillonnage d'urine et équivalente à celle de l'échantillonnage endocervical, a été démontrée pour le diagnostic des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* (99). L'échantillonnage endocervical peut également être réalisé chez les femmes.

La culture de *M. genitalium* à partir d'échantillons cliniques est très rare. Il nécessite une étape de culture cellulaire sur des cellules Vero. Le diagnostic est surtout moléculaire, plusieurs techniques « maison » de PCR tel que la PCR point final ou la PCR en temps réel ont été développés, en utilisant comme cible, la plupart du temps, le gène adhésine MgPa (mgpB) ou le gène de l'ARNr 16S. Les deux techniques les plus fréquemment utilisées sont Taqman PCRs en temps réel. Jensen *et al.* (60) ont utilisé comme cible une région de mgpB, avec une sensibilité de détection inférieure à cinq copies par réaction, alors que Yoshida *et al.* (113) ont préféré utilisé une région de 517 pb codant pour le gène de l'ARNr 16 S avec une sensibilité de détection inférieur à dix copies par réaction. Les auteurs de l'étude comparative des deux méthodes ont rapporté

une sensibilité et une spécificité de 95% et 100% de celui qui utilise le gène de l'ARNr 16S et de celui qui utilise le gène *mgpB*, respectivement.

Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative de la sensibilité de détection. Les résultats de certaines évaluations de PCR multiplex pour détecter simultanément divers micro-organismes, y compris *M. genitalium* ont été publiés. La mise au point de kits commercialisés multiplex doit permettre une utilisation plus large de la PCR à des fins diagnostiques. Tel est le cas du kit Seeplex STD6 (Seegene), et du kit Dx CT / NG / MG (Bio-Rad), qui détectent les trois principaux agents responsables de NGU et cervicite, *M. genitalium*, *C. trachomatis*, et *N. gonorrhoeae*.

7. Le portage asymptomatique

Comme pour tous les mycoplasmes urogénitaux, le portage peut être asymptomatique, mais la prévalence est faible dans la population globale (<6%). La détermination d'un seuil pathogène est difficile en raison de la difficulté de la mise en culture de cette bactérie. La PCR est la technique de référence pour la détection de *M. genitalium*. Chez les patients asymptomatiques, le lien de causalité entre la détection par PCR de *M. genitalium* et la maladie peut être établi par une évaluation cyto bactériologique d'un prélèvement d'urètre ou frottis cervical. La présence de plus de quatre leucocytes polynucléaires sur plus de quatre champs à fort grossissement ($\times 1000$) sur un frottis urétral, coloré avec du bleu de méthylène, est un diagnostic pour une urétrite, même sans symptômes cliniques. Pour un frottis vaginal à fort grossissement, la cervicite est diagnostiquée par la présence de plus de 30 leucocytes polynucléaires sur plus de quatre champs à fort grossissement. Si l'un de ces deux examens est positif, cela prouve une infection asymptomatique, ce qui nécessite une gestion adéquate.

8. Sensibilité et Traitement antibiotique

La PCR en temps réel quantitative avec une étape de culture cellulaire a été conçu pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques de *M. genitalium*. Cependant, il est indisponible pour une utilisation courante.

8.1. Résistance intrinsèque

L'absence de paroi cellulaire rend tous les organismes de la classe des Mollicutes résistante aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire, tels que les bêta-lactames, des glycopeptides, et la fosfomycine. Ils sont également résistants aux polymyxines, aux sulfamides, au triméthoprim, à l'acide nalidixique, à la rifampicine et au linézolide (9).

8.2. Antibiotiques actifs

Les antibiotiques potentiellement actives contre les mycoplasmes et utilisés pour le traitement sont : les tétracyclines ; les macrolides, les lincosamides, les streptogramines et ketolides (MLSK); et les fluoroquinolones (9). Ces antibiotiques atteignent des concentrations élevées à l'intérieur des cellules qui attaquent ainsi mycoplasmes intracellulaires. Seuls les fluoroquinolones et ketolides ont un effet bactéricide démontré in vitro. Ces trois familles sont également actives contre les bactéries potentiellement associées aux mycoplasmes dans les infections génitales. Les tétracyclines constituent le traitement de première ligne contre les infections à mycoplasmes uro-génitales, mais leur contribution pour le traitement des infections *M. genitalium*. Seront discutés plus tard.

Les auteurs d'une étude (8) ont démontré l'activité bactéricide de l'érythromycine (MLSK classe antibiotique) in vitro contre *M. genitalium*. Azithromycine a les plus faibles concentrations minimales inhibitrices (CMI) (9).

Les fluoroquinolones plus récents sont les plus actifs en particulier la moxifloxacin (11). Ceci permet d'obtenir une alternative importante pour le traitement des infections génitales.

8.3. La résistance acquise (9, 13, 14, 58)

L'altération des cibles sont les seuls mécanismes de résistance acquise qui ont été décrites *in vivo* pour *M. genitalium*. Le support génétique de la résistance correspond à des mutations qui concernent seulement la famille MLSK et les fluoroquinolones. Pour la famille antibiotique MLSK, les mutations de la cible ribosome, dans la boucle centrale du domaine V de ARNr 23S, sont les principaux mécanismes de résistance aux macrolides de *M. genitalium*. Douze souches de *M. genitalium* résistants aux macrolides ont été isolées à partir de patients australiens et scandinaves présentant une urétrite traitée par azithromycine (13,58). Sept souches ont été analysés et ont présenté chacune une mutation, A2058G, A2058 C, ou A2059G, conférant une résistance aux macrolides. Dans la plupart des cas, ces mutants résistant aux macrolides ont été sélectionnés au cours du traitement par l'azithromycine.

Cette résistance aux macrolides semble être en augmentation chez *M. genitalium* provoquant un échec thérapeutique avec l'azithromycine 1 g chez 85% des patients infectés par une souche mutante. Les mutations de gènes cibles, *gyrA* et *gyrB* (ADN gyrase) et *parC* et *parE* (topoisomérase IV), sont les mécanismes de résistance les plus fréquent aux fluoroquinolones développé par mycoplasmes. L'échec thérapeutique a été rapporté chez des patients se présentant avec une NGU à *M. genitalium* positif après le traitement à la lévofloxacin. Certaines mutations ont été détectées dans le gène *parC* de *M. genitalium* après le traitement. En outre, les mutations isolées dans les quatre gènes ont récemment été démontré *in vivo* pour neuf des 28 échantillons cliniques étudiés. Ils étaient associés avec la résistance clinique à *M. genitalium* aux fluoroquinolones chez 32% des patients (9/28) (14).

Chapitre 2: Validation de méthode selon les normes du COFRAC

Le COFRAC est le Comité Français d'Accréditation, constituée sous la forme d'une association à but non lucratif en 1994 (www.cofrac.fr , consulté le 18-07-2016).

Il a pour mission de :

- procéder à l'accréditation conformément aux normes françaises(NF) européennes (EN) ou internationales (ISO) de tous les organismes intervenant pour l'évaluation de la conformité à un référentiel et dans tous les domaines où une accréditation est utile;
- développer la confiance du marché envers les organismes accrédités;
- assurer une reconnaissance européenne et internationale du système d'accréditation français; négocier des accords avec d'autres organismes accréditeurs ; assurer la représentation des intérêts français dans les instances et organismes européennes et internationaux traitant l'accréditation.

La validation de méthodes se fera conformément aux recommandations du COFRAC comme étant appropriées pour répondre aux exigences des normes NF EN ISO 15189 (**Norme Internationale ISO 15189, 2012**) avec la vérification sur site des rubriques suivantes (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>):

1. La Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître ses performances.

2. La Contamination

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques, notamment au niveau des systèmes de pipetage des échantillons (contamination inter-échantillons) et de distribution des réactifs (contamination inter-réactifs).

➤ Contamination inter-échantillons :

Une étude de contamination inter-échantillon est à effectuer pour tous les appareils automatisés. Elle porte surtout sur les analytes qui peuvent être affectés par ce phénomène en raison des variations physiologiques observées en pratique courante. Cette étude sera répétée en cas de doute sur le fonctionnement du système automatisé, et en particulier du système de lavage et/ou de décontamination ;

➤ Contamination inter-réactifs :

Le phénomène de contamination inter-réactif peut se produire sur un analyseur lorsque le système de distribution est commun à tous les réactifs.

3. Comparaison des méthodes

Dans le cadre d'appareils en miroir, la comparabilité des résultats doit être assurée, lors de la validation initiale, et de façon continue (**Norme Internationale ISO 15189, 2012**).

Si des différences significatives sont observées, le biologiste médical formalise la conduite à tenir :

- Adaptation des intervalles de référence,
- Information des cliniciens prescripteurs,
- Utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction (attention aux problèmes d'interprétation des résultats de comparaisons inter-laboratoires avec les EEQ ou les CIQ externalisés),
- Rejet de la méthode si elle ne correspond pas au cahier des charges initial.

4. La Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, ... Il permet de paramétrer les critères d'acceptation des antériorités en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aides à la décision.

Lorsque les résultats obtenus sont supérieurs aux limites de conformité préétablies, le laboratoire vérifiera si les différences observées, compte tenu du nombre de valeurs et du niveau de concentration des échantillons, sont significatives et les confrontera aux exigences cliniques.

Fidélité ou sensibilité analytique : $[VP/(VP + FP)] \times 100$

5. Interférences et spécificité analytique

Une méthode « sélective » ou « spécifique » permet le dosage d'un analyte sans interférence dans une matrice complexe. Des substances dites « interférentes » altèrent le signal de mesure pouvant entraîner des résultats erronés.

Une étude expérimentale pertinente doit être effectuée dans le cas d'une portée de type B afin d'établir l'influence de substances présentes dans la matrice et potentiellement interférentes.

Spécificité analytique : $[VN/(VN + FN)] \times 100$

6. La Justesse

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie).

Dans les LBM, les matériaux de référence certifiés sont peu utilisés en pratique courante ; il est donc difficile de parler stricto sensu de « valeur vraie » et par là-même de justesse.

Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la « valeur vraie ».

L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ).

La valeur assignée peut être biaisée, et devrait, idéalement, être déterminée grâce à une méthode de référence dont les résultats sont traçables au SI ou aux étalons internationaux.

La commutabilité des échantillons, c'est-à-dire leur capacité à se comporter comme des échantillons réels (échantillons de patient) quelle que soit la méthode utilisée, doit être prise en compte. En effet, les effets de matrice engendrés par les différents traitements subis par les échantillons de contrôle durant leur préparation (lyophilisation, congélation, ajout de conservateur, surcharge, mélange, ...) peuvent être à l'origine de biais qui ne sont pas retrouvés avec des échantillons patients.

La connaissance de la valeur vraie repose actuellement sur les valeurs assignées associées aux échantillons de contrôle. Ce sont des valeurs consensuelles (moyenne de l'ensemble des participants (si les seuils de décision pour l'examen concerné sont standardisés (HAS, consensus, ...) ou moyenne par groupe de pairs en fonction des méthodes, des analyseurs ou des fournisseurs).

Justesse ou % de corrélation : $[VP + VN / (VP + VN + FP + FN)] \times 100$

PARTIE II: TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 1: Justificatif, objectifs et cadre de l'étude

1. Justification de l'étude

Le Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) BIO 24 est un laboratoire engagé dans la démarche qualité depuis 1998 avec la norme ISO 9001 et à partir de 2009 avec la norme ISO 15189.

Pour répondre aux exigences de ces normes d'une part et à certains axes de la politique qualité du laboratoire (l'élargissement progressif du plateau technique ; l'amélioration de la prise en charge des patients) d'autre part, le LBM BIO a entrepris l'installation d'un nouvel équipement (AMPLIX de BIOSYNEX) pour la mise en place d'un nouveau test de détection de *M. genitalium* par amplification génique (PCR en temps réel).

Les IST constituent mondialement un problème majeur de santé publique avec une incidence de 357 millions de cas par an

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/fr/>; consulté le 16-07-2016).

L'absence d'outil adéquat de diagnostic est souvent l'origine des complications et de séquelles graves notamment l'infécondité.

Dans la lutte contre ces infections, le LBM joue un rôle très important, celui du diagnostic biologique avec l'utilisation des méthodes de référence recommandées par les sociétés savantes (53, 80).

M. genitalium est un agent bactérien responsable des IST comme le montre de nombreuses études (95).

En Afrique et particulièrement au Sénégal, l'absence de test de dépistage de *M. genitalium* dans les LBM est à l'origine de l'absence des données épidémiologiques et de la responsabilité cette bactérie dans certaines IST telles que les urétrites non gonococciques et non chlamydia.

Ainsi le LBM BIO 24 a envisagé la mise en place d'un test de détection par amplification génique par PCR multiplex en temps réel de *C. trachomatis* et de *M. genitalium*.

2. Objectifs de l'étude

2.1. Objectif général

L'objectif général est la validation de l'automate AMPLIX de BIOSYNEX pour la détection de *C. trachomatis* et *M. genitalium* par PCR en temps réel conformément aux recommandations de la norme ISO 15189 et de SH GTA 04.

2.2. Objectifs spécifiques

- Donner les performances analytiques de AMPLIX ;
- Comparer AMPLIX avec Cobas TaqMan de ROCHE DIAGNOSTICS pour la détection de *C. trachomatis* par PCR en temps réel ;
- Documenter l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons utilisés pour la recherche de *C. trachomatis* en routine.

3. Cadre de l'étude : LBM BIO 24

Le LBM BIO 24, est un laboratoire crée en 1994 par un médecin biologiste sénégalais. Il est situé au 13 bis rue Saint Michel (ex Dr Thèze) proche du Collège Saint Michel/U.C.A.O.

De société unipersonnelle à responsabilité limitée, le laboratoire est devenu société anonyme en juin 2001. Il intervient dans le domaine de la biologie médicale.

Il fonctionne en permanence 24 heures sur 27 et 07 jours sur 07.

Son capital humain (effectif en personnel) est de 74 personnes.

Le laboratoire est administré par un Directeur (médecin biologiste) qui est assisté, sur le plan du management par 9 Managers repartis dans les domaines techniques et

administratifs.

LBM BIO24 est un laboratoire polyvalent avec les secteurs suivants :

- Biochimie générale et spécialisée
- Hématologie cellulaire, Hémostase et Immuno-Hématologie
- Immunologie : Allergie et Auto-immunité
- Microbiologie : Sérologie infectieuse, Bactériologie, Parasitologie et Mycologie
- Fertilité : Spermiologie, Procréation Médicalement Assistée (IAC, FIV, ICSI)
- Sous-traitance : Anatomopathologie, tout examen de biologie non réalisé sur site

Laboratoire certifié :

- **ISO 9002 version 1994** en décembre 2001,
- **ISO 9001 version 2000** en novembre 2003 ;
- **ISO 9001 version 2008** en 2009.
- Accrédité par le COFRAC **selon la norme ISO 15 189** spécifique aux laboratoires de Biologie Médicale en mars 2012.

Chapitre 2: Méthodologie.

1. Matériel et Réactifs

1.1. AMPLIX

- Extracteur ExiPrep™ 16DX
- Thermocycleur DT-96 (DNA-Technology)
- Unité informatique avec logiciel AMPLIX Real Time
- Support de paillasse
- Portoir des embouts à filtre
- Portoir des tubes à élution
- Portoir des tubes échantillon
- Perceuse
- Outil pour retrait du couver
- Pipettes : 20 µL, 200 µL et 1000 µL
- Embouts filtrés
- Centrifugeuse de paillasse
- Kit d'extraction : ExiPrep™ Dx Bacteria Genomic DNA (voir **fig.9**)
 - Boîtes de tampon d'extraction (Buffer Cartrige 2)
 - Boîtes de tampon de lavage (Buffer Cartrige 1)
 - Tubes échantillon
 - Embouts à filtre
 - Tubes à élution
 - Bouchons tube à élution
 - Bacs à déchet
 - Couvercles de protection des tubes à élution
 - Papier filtre adhésif anti-contamination
 - Tampon pour resuspension (TR), Tampon Phosphate (PBS)
- RealLine *Chlamydia trachomatis*/*Mycoplasma genitalium*

- Contrôle positif (PC) : 1 ml
 - Tubes d'amplification (12x8 tubes) contenant le Master Mix lyophilisé prêt à l'emploi ;
 - Film adhésif pour PCR.
- RealLine Internal Control
- Solution de reconstitution : 2 flacons de 4 ml
 - Contrôle Interne (IC) : 6 flacons lyophilisés
 - Diluant échantillon (DE) : 4 flacons de 15 ml
- Milieu de recueil et de transport d'échantillons

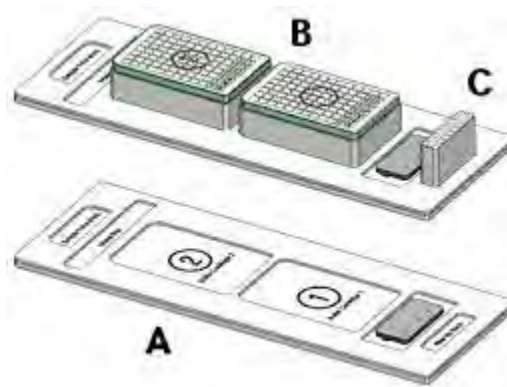


Figure 9: Plan de travail pour la préparation des échantillons

A: support de paille; B: boîtes d'extraction et de lavage; C: portoir d'embouts.

1.2. COBAS TAQMAN

- ✓ Analyseur Cobas TaqMan (**fig.17**)
- ✓ l'unité informatique et l'onduleur Logiciel AmpliLink 3.1
- ✓ Portoir K
- ✓ Tubes K
- ✓ Vortex
- ✓ Transporteur K (permet de transporter le portoir K dans le thermocycleur)
- ✓ Décapsuleur de tubes K

- ✓ Portoir de plaques K
- ✓ AMPLICOR CT/NG Specimen Preparation Kit
 - Tampon de lyse,
 - Diluant d'échantillon
- ✓ COBAS TaqMan Amplification et détection (**fig.10**): CT Test, v2.0 (48 tests)
 - Contrôle interne avec 8 copies/μL d'ADN plasmidique non infectieux
 - Contrôle positif
 - Contrôle négatif
 - Master Mix
 - Tampon Mn^{2+}



Figure 10: Réactifs COBAS TaqManTM CT v2.0 (molecular.roche.com consulté le 18-07-2016)

- ✓ Micro Test M4RT BL Kit pour collecte et transport des échantillons endocervicaux
- ✓ Tubes en polypropylène de 1,5 ml (fond conique)
- ✓ Tubes en polypropylène de 2 ml
- ✓ Portoir des tubes en polypropylène
- ✓ Flacon de 60 ml sans additif pour collecte d'urines et de sperme.
- ✓ Pipettes
- ✓ Embouts à filtre

- ✓ Centrifugeuse Eppendorf.

2. Echantillons et mode de recueil

Quatre types d'échantillons ont été utilisés dans cette étude :

- ✓ Les écouvillons endocervicaux déchargés dans le milieu de transport et de conservation.
- ✓ Les écouvillons urétraux chez les hommes
- ✓ Les urines du premier jet
- ✓ Le sperme

➤ Recueil des échantillons

Les urines du premier jet : 10 à 15 mL du premier jet matinal dans un flacon en polypropylène sans conservateur. Les échantillons d'urines qui ne sont pas traités dans les 24h suivant le prélèvement peuvent être conservés entre 2 et 8° C pendant 7 jours ou congelés à une température ≤ -20 °C.

Sperme : recueillir par masturbation au moins 1 mL de sperme après une miction complète. (Sans contact sexuel), la conservation se fait après prétraitement par congélation.

Les écouvillons endocervicaux : Chez la femme après nettoyage de l'exocol, l'écouvillon est placé à environ 1 cm du canal cervical. Le maximum de cellules endocervicales est obtenu par rotation de l'écouvillon dans l'endocol. L'écouvillon est ensuite placé dans un milieu de transport et peut alors être transporté et conservé entre 15 et 30 °C pendant 7 à 14 jours. Réfrigérer si le transport vers le laboratoire dépasse les 14 jours ou congeler à -20 °C pendant moins de 30 jours.

➤ Evaluation des performances et validation de AMPLIX

Des échantillons positifs détectés avec Cobas TaqMan et conservés à -20 °C. Des échantillons fraîchement collectés pour le diagnostic de *C. trachomatis* sur Cobas TaqMan

➤ Documentation de *M. genitalium*

Des échantillons fraîchement collectés pour le diagnostic de *C. trachomatis* sur AMPLIX.

3. Méthode de validation de AMPLIX

Conformément aux recommandations du COFRAC (SH GTA 04), les critères applicables de validation de AMPLIX sont les suivants :

- Répétabilité
- Reproductibilité
- Contamination
- Variabilité inter opérateur
- Comparaison des méthodes
- Sensibilité, spécificité et justesse
- Effet de la matrice sur les échantillons de sperme

Justification du choix de l'échantillon pour l'évaluation des performances

Les échantillons positifs comparés au matériel de contrôle (constitué d'un ADN purifié) présentent l'avantage de contenir des bactéries entières donc de contrôler à la fois l'extraction proprement dite de l'ADN intracellulaire et la récupération de l'ADN extrait.

3.1. La répétabilité

- Ecouvillon endocervical : Passage d'un pooling de trois patientes positives pour *C. trachomatis* et *M. genitalium* dans la même série sur les 16 positions de l'extracteur **ExiPrep™ 16DX**.
- Urines du premier jet : patient positif pour *C. trachomatis* dans la même série sur les 16 positions de l'extracteur **ExiPrep™ 16DX**.

Résultats attendus : concordance des résultats

3.2. La reproductibilité

Elle sera faite avec au moins deux opérateurs pour les échantillons suivants :

- Des aliquotes du pooling de répétabilité (positif pour *C. trachomatis*/*M. genitalium*)
- Des aliquotes d'un échantillon d'urines du 1^{er} jet positif pour *C. trachomatis*/*M. genitalium*
- Le contrôle négatif
- Le contrôle positif

Chaque opérateur inclura ces échantillons dans 10 séries contenant chacune 12 autres échantillons.

Résultats attendus : concordance des résultats des échantillons

3.3. La contamination inter-Echantillon

Pour évaluer la capacité de **ExiPrep™ 16DX** à ne pas générer une contamination inter-échantillon, 5 séries réalisées avec des patients positifs et négatifs (sur **Cobas TaqMan**). Lors des distributions de la prise d'essai pour extraction et pour amplification, ces patients sont disposés de telle sorte qu'un échantillon négatif soit encadré par deux échantillons positifs (**tableau IV**).

Résultats attendus : tous les échantillons négatifs donnent un résultat négatif

Tableau IV: Plan de la disposition des échantillons pour l'évaluation de la contamination

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	-	+	-	+	-	+	-
B	-	+	-	+	-	+	-	+

3.4. La variabilité inter-opérateur

Elle sera appréciée par les séries effectuées avec les 4 échantillons utilisés lors de reproductibilité

Résultats attendus : concordance des résultats

3.5. Comparaison des méthodes (*C. trachomatis*) : AMPLIX vs TAQMAN

La comparaison entre AMPLIX et Cobas TaqMan se fera :

- ✓ Avec des échantillons positifs conservés à -20 °C (patientèle)
- ✓ Avec des échantillons fraîchement collectés.

Tout échantillon discordant sera retesté sur les deux systèmes.

3.6. Sensibilité, spécificité, fidélité et justesse

Sensibilité diagnostique : $[VP/(VP + FN)] \times 100$

Spécificité diagnostique : $[VN/(VN + FP)] \times 100$

Fidélité (approche) : $[VP/(VP + FP)] \times 100$

Justesse (% de corrélation) : $[VP + VN/(VP + VN + FP + FN)] \times 100$

Résultats attendus : % > 95%

VP : Vrai Positif **VN :** Vrai Négatif **FP :** Faux Positif **FN :** Faux Négatif

3.7. Effet de la matrice avec les échantillons de sperme

Le sperme étant l'un des échantillons qui présente le plus d'inhibiteurs pour la PCR, le but est d'apprécier l'aptitude du système d'extraction à débarrasser ou purifier la prise d'essai de potentiels inhibiteurs lors de l'extraction.

L'échantillon de sperme sera mélangé avec une aliquote d'un échantillon positif puis extrait et amplifié.

Inoculer 100 µL d'un échantillon positif dans 1 ml de sperme mélangé vigoureusement au vortex. Prendre 300 µL de prise d'essai pour l'extraction.

4. Documentation de l'existence de *m. genitalium*

La documentation de l'existence de *M. genitalium* a été effectuée :

- dans un premier temps avec les échantillons positifs pour *C. trachomatis* conservé
- dans un deuxième temps après la validation de AMPLIX avec des échantillons fraîchement collectés durant la période du 14 mars au 30 juin 2016

5. Principes des méthodes

5.1. AMPLIX

➤ Extraction :

L'ADN de *Chlamydia trachomatis*/*Mycoplasma genitalium* est obtenu à l'aide du kit ExiPrep™ Dx Bacteria Genomic DNA après lyse des parois cellulaires par le tampon d'extraction. L'ADN ainsi libéré est adsorbé sur des particules magnétiques de silice activées (**Fig. 11**). L'ADN pur prêt pour l'amplification est obtenu après lavage et élution dans des tampons appropriés à ces effets.

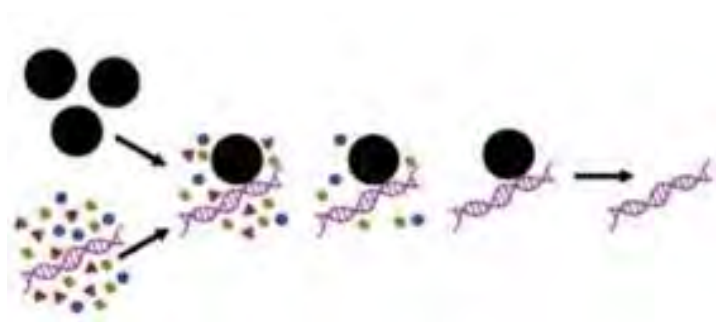


Figure 11: Principe d'extraction de l'ADN

➤ Amplification

Elle se fait par PCR en temps réel par amplification simultanée de l'échantillon et du standard interne (pour le contrôle des inhibiteurs). Toutes les amorces sont doublement conjuguées à leur extrémité par un fluorochrome et son inhibiteur (quencher) qui empêche l'émission de la fluorescence.

La détection est basée sur l'intensité de la fluorescence qui augmente au fur et à mesure que l'amplification progresse (temps réel). L'inhibition de la fluorescence de départ étant levée par l'activité exonucléasique de la Taqpolymérase lors de l'amplification

Cible pour MG : gène GAP (Glycér-Aldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase) avec 117 pb.

Cibles pour CT : gène chromosomique gyrA (83 pb) et gène du plasmide cryptique

ORF1 (130 pb)

Les cibles de CT, de MG et du IC sont détectées par des fluorochromes (sondes marquées) différents.

5.2. COBAS TAQMAN

Le test COBAS TaqMan™ CT v2.0 repose sur deux procédures majeures :

La préparation manuelle de l'échantillon pour obtenir de l'ADN de *C. trachomatis*

L'amplification par PCR simultanée d'ADN cible à l'aide d'amorces complémentaires spécifiques de CT et la détection des amplicons de CT et de l'ADN contrôle interne qui est amplifié et détecté simultanément avec l'échantillon.

Le mélange réactionnel contient deux paires d'amorces et des sondes spécifiques d'un plasmide cryptique de CT, de l'ADN chromosomique du gène *ompA* de CT et de l'ADN du contrôle interne de CT.

La détection des amplicons utilise la technologie PCR en temps réel. Les sondes sont doublement marquées avec un fluorophore et un inhibiteur de la fluorescence. Les sondes du plasmide et du gène *ompA* ont le même fluorophore tandis que celui du contrôle interne CT a un fluorophore différent.

Lorsque la sonde n'est pas hybridée, la fluorescence est inhibée suite aux effets de transfert d'énergie. Par contre lorsque la sonde est hybridée à sa cible, l'inhibition de la fluorescence est levée par clivage de l'inhibiteur à l'aide de l'activité nucléasique 5'→3' de l'ADN polymérase thermostable. La détection se fait donc en temps réel au fur et à mesure que l'amplification se poursuit (**Fig. 12**).

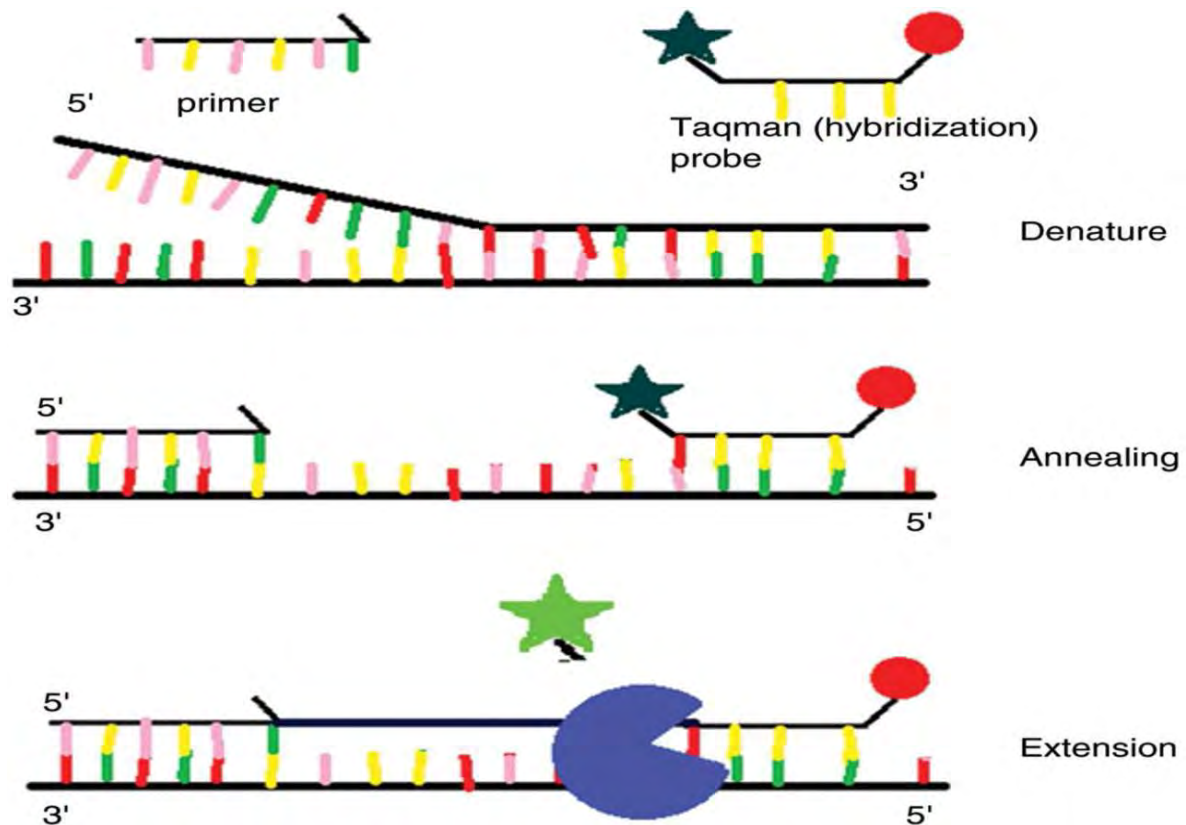


Figure 12: Principe du COBAS TaqMan (molecular.roche.com consulté le 26-07-2016)

6. Prétraitement des échantillons

➤ AMPLIX

Identifier un tube à bouchon fileté de 1,5 ml pour chaque échantillon à tester

Urines du premier jet

Homogénéiser les urines du premier jet matinal et transférer 1,5 ml dans un tube de 2 ml.

Centrifuger à 12.500 rpm pendant 5 min.

Éliminer le surnageant et congeler à -20 °C si l'extraction n'est pas réalisée aussitôt.

Resuspendre le culot avec 400 µL du Tampon de Resuspension.

Sperme

Recueillir 300 µL de sperme fluidifié dans un tube conique

Additionner 1 mL de PBS et mélanger au vortex.

Centrifuger à 12.500 rpm pendant 5 min.

Eliminer le surnageant et congeler à -20 °C si l'extraction n'est pas réalisée aussitôt.

Resuspendre le culot avec 400 µL du Tampon de Resuspension.

Les échantillons recueillis par écouvillonnage

Les échantillons recueillis par écouvillonnage endocervical ou urétral dans le milieu de transport sont prêts pour l'extraction par ExiPrep™ DX.

Préparation des contrôles

Contrôle Interne (Internal Control)

Ajouter 1 mL de RSC dans un flacon de IC, mélanger au doucement et laisser reposer pendant 15 min puis homogénéiser avant chaque pipetage. IC ainsi préparé est stable pendant 30 jours à 2 – 8 °C.

Contrôle négatif

Il se prépare directement dans le tube échantillon avec 20 µL de IC et 400 µL du diluant IC (à défaut du TR, milieu de transport ou de H₂O distillée).

Contrôle positif

Il se prépare directement dans le tube échantillon avec 20 µL de IC + 30 µL de PC + 370 µL du diluant IC (à défaut du TR, milieu de transport ou de H₂O distillée).

Un échantillon connu positif peut également être utilisé comme contrôle positif.

Extraction des échantillons et contrôles

Sur le support de pailleasse (**fig. 13**), les éléments seront disposés dans l'ordre suivant :

Portoir des tubes échantillons et contrôles

Poubelle à déchet

Boite de tampon d'extraction

Boite de tampon de lavage et d'élution

Portoir des tubes d'élution avec le couvercle de protection anticontamination

Portoir des embouts filtrés



Figure 13: Présentation des éléments sur le support de pailleasse

Déterminer le nombre d'échantillon à extraire. Pour un meilleur rendement, il est souhaitable pour une série d'extraire 14 échantillons, un NC et un PC soit un maximum de 16 échantillons. A défaut 6 échantillons, un NC et un PC soit 8 échantillons.

Renseigner le plan de travail et disposer les tubes échantillon, les tubes à élution, les embouts filtrés et percer les boites en fonction de la disposition des échantillons sur le plan de travail.

Les boites d'extraction, de lavage et d'élution sont constituées de 8 (lignes) x 12 (colonnes) puits. (**tableau V**)

Les patients occupent les positions des 2 premières colonnes et 6 puits des lignes comme le montre le schéma ci-dessous.

Tableau V: Disposition des puits sur les boîtes de tampon d'extraction et de lavage

Puits échant		Puits extraction et lavage									
A1	B1	<i>A1</i>	<i>B1</i>	<i>A1</i>	<i>B1</i>	<i>A1</i>	<i>B1</i>	<i>A1</i>	<i>B1</i>	<i>A1</i>	<i>B1</i>
A2	B2	<i>A2</i>	<i>B2</i>	<i>A2</i>	<i>B2</i>	<i>A2</i>	<i>B2</i>	<i>A2</i>	<i>B2</i>	<i>A2</i>	<i>B2</i>
A3	B3	<i>A3</i>	<i>B3</i>	<i>A3</i>	<i>B3</i>	<i>A3</i>	<i>B3</i>	<i>A3</i>	<i>B3</i>	<i>A3</i>	<i>B3</i>
A4	B4	<i>A4</i>	<i>B4</i>	<i>A4</i>	<i>B4</i>	<i>A4</i>	<i>B4</i>	<i>A4</i>	<i>B4</i>	<i>A4</i>	<i>B4</i>
A5	B5	<i>A5</i>	<i>B5</i>	<i>A5</i>	<i>B5</i>	<i>A5</i>	<i>B5</i>	<i>A5</i>	<i>B5</i>	<i>A5</i>	<i>B5</i>
A6	B6	<i>A6</i>	<i>B6</i>	<i>A6</i>	<i>B6</i>	<i>A6</i>	<i>B6</i>	<i>A6</i>	<i>B6</i>	<i>A6</i>	<i>B6</i>
A7	B7	<i>A7</i>	<i>B7</i>	<i>A7</i>	<i>B7</i>	<i>A7</i>	<i>B7</i>	<i>A7</i>	<i>B7</i>	<i>A7</i>	<i>B7</i>
A8	B8	<i>A8</i>	<i>B8</i>	<i>A8</i>	<i>B8</i>	<i>A8</i>	<i>B8</i>	<i>A8</i>	<i>B8</i>	<i>A8</i>	<i>B8</i>

Ainsi pour le premier patient (A1), placer les dents du perceur de telle sorte qu'il perce les puits A1 de même pour les patients A2 à A8 (**fig.14**). Pour le 9^{ème} patient (B1), placer les dents du perceur de telle sorte qu'il perce les puits B1 de même pour les patients B2 à B8 (**fig.15**).

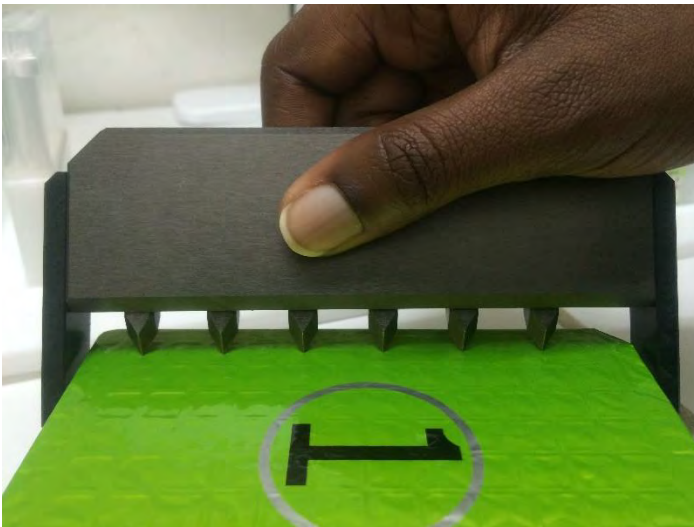


Figure 14: Disposition de la perceuse sur le puits A

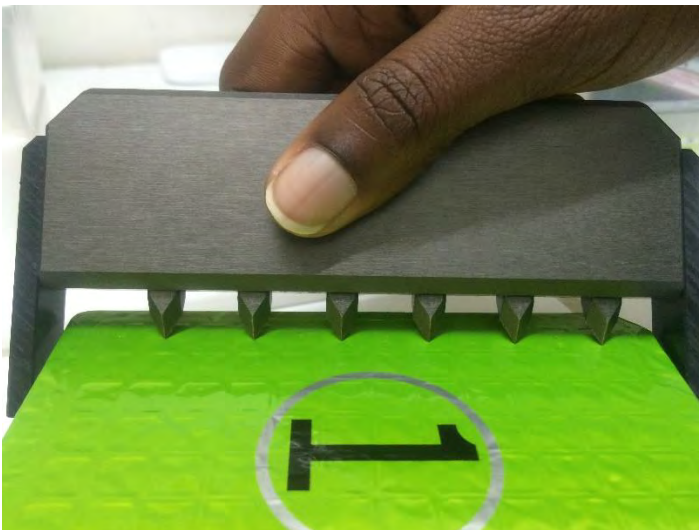


Figure 15: Disposition de la perceuse sur les puits B

N.B. On peut donc choisir un nombre de patients de 1 à 16, mais pour un meilleur rendement, il est préférable de travailler avec une série de 8 (A1 à A8) ou de 16 positions (A1 à A8 et de B1 à B8).

Après homogénéisation au vortex, distribuer dans chaque cupule placée sur le portoir échantillon 20 µL de IC et 400 µL de l'échantillon prêt pour l'extraction.

Lecture des résultats sur AMPLIX

La détection sur AMPLIX se fait graphiquement, le détecteur enregistre la fluorescence émise dans chaque cupule après chaque cycle. L'intensité de la fluorescence de base s'appelle « Background » c'est à dire le seuil minimal de détection. A chaque nouveau cycle il y a une lecture de la fluorescence. En cas d'amplification d'ADN cible, le signal de fluorescence augmente et le capteur enregistrera la valeur et la reproduira graphiquement.

Quand cette fluorescence devient supérieure à celle du Background, le détecteur détermine un « Crossing Point (CP) », c'est à partir de ce point précis auquel la valeur de la fluorescence augmente exponentiellement. Si la valeur de la fluorescence ne dépasse pas celle du background, l'échantillon est considéré comme négatif.

Le contrôle négatif ne montre aucun signal puisqu'il ne contient pas d'ADN cible.

Ainsi nous avons donc trois types de fluorescence : Fam pour le contrôle interne, Hex pour la détection de *C. trachomatis* et Rox pour la détection de *M. genitalium*.

➤ COBAS TAQMAN

Urines du premier jet

- Dans un tube à bouchon fileté de 2, 0 mL étiqueté, introduire 500 µL de tampon de lavage (CT/NG URINE WASH)
- Mélanger vigoureusement l'échantillon d'urine à analyser au vortex pendant 3 à 10 sec.
- Retirer soigneusement le couvercle du tube ou flacon d'urines
- Ajouter 500 µL de chaque échantillon d'urines dans le tube à bouchon fileté de 2, 0 mL destiné à le recevoir. Fermer le tube et mélanger vigoureusement au vortex.

➤ **Sperme**

- Recueillir 100 μ L de sperme fluidifié dans un tube conique
- Additionner 200 μ L de PBS et mélanger au vortex.
- Centrifuger à 12500 g pendant 10 min, éliminer le surnageant.
- Congeler le culot à -20 °C pendant au moins 24 h pour dénaturer les inhibiteurs.
- Décongeler le culot par addition de 1 ml de la solution de lavage. (Wash)
- Broyer le culot à l'aide d'un embout et mélanger au vortex.

Incuber les tubes d'urines et de sperme pendant 15 min à 37 °C puis centrifuger 5 min à 12500 g.

Éliminer le surnageant et laisser égoutter chaque tube sur du papier absorbant.

Ajouter dans chaque tube 250 μ L de CT/NG LYS et fermer

Mélanger au vortex, incuber pendant 15 min entre 15 et 30 °C.

Ajouter 250 μ L de diluant (CT/NG DIL), mélanger au vortex et centrifuger 10 min à 12500 g.

Transférer le surnageant dans un autre tube à vis en polypropylène identifié

Les échantillons recueillis par écouvillonnage

- Identifier un tube à bouchon fileté de 2, 0 ml pour chaque échantillon à tester
- Vortexer vigoureusement les échantillons pendant 15 secondes.
- Distribuer 100 µL de l'échantillon dans les tubes contenant 100 µl de CT/NG LYS.
- Distribuer dans chaque tube identifié 100 µL de CT/NG LYS
- Vortexer vigoureusement et incuber pendant 10 min. Ajouter 200 µL de diluant dans chaque tube
- Fermer puis mélanger vigoureusement les tubes au vortex
- Incuber à température ambiante pendant 10 min.

A cette étape, si l'amplification n'est pas réalisée dans les deux heures qui suivent, les tubes d'urines de spermes et les tubes contenant les prélèvements d'écouvillons peuvent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 8 °C pendant une durée maximum de 7 jours.

Préparation des contrôles et du mélange réactionnel.

Contrôles

- Préparation des témoins actifs

- Identifier deux tubes de 2, 0 ml à bouchon fileté avec Témoin actif CT (+) sur le premier et Témoin actif CT (-) sur le second
- Dans chacun des tubes ainsi identifiés, introduire 1 ml de CT/NG DIL
- Mélanger vigoureusement les contrôles au vortex
- Ajouter 100 µl de chaque contrôle dans le tube Témoin actif auquel il est destiné
- Refermer et mélanger vigoureusement les tubes Témoins actifs au vortex

Ces Témoins actifs sont stables, entre 15 et 30° C, jusqu'à la fin de la journée

- Préparation des témoins destinés aux prélèvements endocervicaux :

- Identifier deux nouveaux tubes Témoins traités CT (+) et CT (-)
- Dans chacun de ces tubes, introduire 100 µL de CT/NG LYS
- Ajouter dans chaque tube 100 µL de M4RT
- Fermer les tubes et mélanger vigoureusement au vortex
- Ajouter 200 µl de chaque Témoins actifs dans le tube Témoin traité correspondant
- Fermer les tubes, Mélanger vigoureusement au vortex puis Laisser incubé pendant 10 min à température ambiante (entre 15 et 30 °C).

Ces Témoins traités sont stables, entre 15 et 30 °C, jusqu'à la fin de la journée

- *Préparation des témoins destinés aux prélèvements d'urines*

- Identifier deux nouveaux tubes Témoins traités CT (+) et CT (-)
- Ajouter 250 µL de CTNG LYS dans un tube de 2 ml puis 250 µl du témoin actif choisi
- Fermer les tubes, Mélanger vigoureusement au vortex puis Laisser incubé pendant 10 min à température ambiante (entre 15 et 30 °C).

Ces Témoins traités sont stables, entre 15 et 30 °C, jusqu'à la fin de la journée.

Mélange réactionnel : à faire extemporanément

Laisser les réactifs d'amplification équilibrés à la température ambiante pendant 30 min

Le mélange réactionnel est constitué de 3 réactifs (CT MMX, CT IC et CT Mn²⁺)

Pour 18 tests effectuer, dans le tube CT MMX, le mélange suivant : 50 µL de CT IC + 150 µL de CT Mn²⁺ dans le tube de CT MMX

Vortexer les flacons CT IC et CT Mn²⁺

Homogénéiser le mélange réactionnel ainsi reconstitué en le retournant 10 fois.

Attention, le mélange réactionnel est photosensible, il doit être protégé de la lumière.

Une fois reconstitué, le mélange réactionnel est stable 2 heures à température ambiante

ou 16 heures à 2 – 8°C.

NB : Préparer un volume de mélange réactionnel selon le nombre de test à faire.

- Placer les tubes K sur le portoir K. Si la série comporte moins de 24 tests, les positions suivantes doivent être obligatoirement occupées pour équilibrer le porteur K dans le thermocycleur : **1, 2, 5, 20, 23 et 24**.
- A l'aide du décapsuleur, retirer les couvercles des tubes K.
- Distribuer dans chaque tube K 50 µl du mélange réactionnel.
- Dans chaque tube K contenant le mélange réactionnel, distribuer conformément au plan de travail 50 µl de chaque échantillon et contrôle
- Mélanger avec 3 aspirations sans former des bulles puis fermer les tubes K à l'aide du décapsuleur.
- Vérifier que les volumes adéquats ont été ajoutés
- Transporter le porteur K dans la salle d'amplification. : L'amplification doit commencer dans les 90 min suivant l'ajout des échantillons et des témoins traités aux tubes K correspondants.

NB : Pour éviter tout risque de contamination par le CTL +, celui-ci sera traité en dernier après fermeture de tous les K tubes.

Enregistrer les patients dans COBAS LINK, charger les extraits dans le thermocycler et lancer la PCR (**fig.16**).



Figure 163: Extracteur automatique, le système informatique de pilotage (AMPLIX) et le thermocycleur

Ainsi nous avons donc trois types de fluorescence : Fam pour le contrôle interne, Hex pour la détection de *C. trachomatis* et Rox pour la détection de *M. genitalium*.



Figure 17: Analyseur COBAS® TaqMan® 48

Chapitre 3: Résultats

Notre étude s'est ouverte sur deux volets :

- Le 1^{er} volet porte sur la validation de la nouvelle technique instaurée au laboratoire Bio 24. Il inclut la comparaison de cette méthode avec la méthode de référence et l'étude des critères de performance.
- Le 2^{ème} volet porte sur l'analyse des échantillons par AmpliX pour la détection de *C. trachomatis* et *M. genitalium*.

Les prélèvements utilisés proviennent d'une population venue pour des analyses spécifiques dont la demande est la recherche de *C. trachomatis*.

1. Évaluation des performances de la technique AMPLIX

Nous avons évalué le nouvel appareil AMPLIX de la firme BIOSYNEX en analysant *C. trachomatis* et *M. genitalium* en se basant sur les critères de performance établis par le COFRAC. Les résultats obtenus ont été les suivants :

1.1. La répétabilité

Pour l'évaluation de la Répétabilité, celle des écouvillons endocervicaux a été satisfaisante dans la mesure où les extractions du pooling ont donné des résultats identiques soit 16 pour CT et 15 pour MG après amplification avec la détection qui débute pour les canaux : Hex de 24 – 25 cycles Rox 35 – 38 cycles Fam 37 – 30 cycles (Voir tableau VI).

Tableau VI: Résultats de la répétabilité des pooling endocervicaux

Positions	Identification du tube	Cp, Fam	Cp, Hex	Cp, Rox
A1	Repeta_A1 (pooling)	28,4	24,7	36,8
A2	Repeta_A2 (pooling)	29,9	24,8	35,8
A3	Repeta_A3 (pooling)	29,9	25,1	37,5
A4	Repeta_A4 (pooling)	30,0	24,9	37,3
A5	Repeta_A5 (pooling)	29,7	24,9	37,2
A6	Repeta_A6 (pooling)	29,8	24,6	38,2
A7	Repeta_A7 (pooling)	29,3	24,7	36,7
A8	Repeta_A8 (pooling)	29,3	24,0	35,7
B1	Repeta_B1 (pooling)	28,9	24,6	37,7
B2	Repeta_B2 (pooling)	28,3	24,8	35,9
B3	Repeta_B3 (pooling)	29,3	24,8	36,1
B4	Repeta_B4 (pooling)	29,3	24,7	36,3
B5	Repeta_B5 (pooling)	28,7	25,1	37,9
B6	Repeta_B6 (pooling)	29,7	24,3	38,9
B7	Repeta_B7 (pooling)	27,9	24,0	36,9
B8	Repeta_B8 (pooling)	29,3	24,3	-

Fam : contrôle interne, Hex: *C. trachomatis*, Rox: *M. genitalium*

Ainsi pour CT, nous avons eu 16/16 soit 100% d'amplification et MG 15/16 soit 93,75% d'amplification. La répétabilité des urines a également été satisfaisante d'après les données reçues (**voir tableau VII**).

Tableau VII: Répétabilité des urines

Positions	Identification du tube	Cp, Fam	Cp, Hex	Cp, Rox
A1	Repeta_A1 (PJ)	28,3	25,9	
A2	Repeta_A2 (PJ)	28,3	26,1	
A3	Repeta_A3 (PJ)	28,3	26,2	
A4	Repeta_A4 (PJ)	28,3	26,0	
A5	Repeta_A5 (PJ)	28,1	26,1	
A6	Repeta_A6 (PJ)	28,7	26,6	
A7	Repeta_A7 (PJ)	28,3	26,5	
A8	Repeta_A8 (PJ)	28,0	26,8	
B1	Repeta_B1 (PJ)	28,5	26,3	
B2	Repeta_B2 (PJ)	28,5	26,5	
B3	Repeta_B3 (PJ)	28,1	26,0	
B4	Repeta_B4 (PJ)	28,3	26,4	
B5	Repeta_B5 (PJ)	29,2	27,1	
B6	Repeta_B6 (PJ)	28,7	26,5	
B7	Repeta_B7 (PJ)	29,6	27,5	
B8	Repeta_B8 (PJ)	30,3	26,8	

PJ : premier jet

Les extractions de l'urine ont donné des résultats attendus après amplification avec la détection qui débute pour les canaux : Hex: 25 – 27 cycles et Fam: 28 – 30 cycles.

1.2. La Reproductibilité

La reproductibilité des contrôles positifs et négatifs, du pooling et de l'échantillon a été bien satisfaisante comme le montre **le tableau VIII**.

Nous avons eu pour le pooling : 21/21 soit 100% des résultats identiques pour CT et 19/21 soit 90% pour MG.

Pour l'échantillon 1601126192PJ : 100% des résultats identiques pour CT et 20/21 soit 95% pour MG.

Les 30 passages des contrôles sont satisfaisants à 100% pour CT et MG.

Tableau VIII: Evaluation de la fidélité intermédiaire du pooling pv et d'un échantillon 1601126192PJ

Pooling PV					Echantillon 1601126192PJ		
	Date Repro	Fam	Hex	Rox	Fam	Hex	Rox
O p e r a t e u r 1	27/01/16 am	31,3	23,4	38	29,2	23,8	24,6
	27/01/16 pm	30,2	23,8	36,4	30,9	27,4	26,4
	28/01/16 am	29,8	24,6	43,2	28,9	27,1	27,3
	28/01/16 pm	31,3	23,4	36	30,9	28,3	27,4
	29/01/2016	29,3	25	37,5	29,3	27,8	26,6
	30/01/16 am	30,3	24,2	37,9	30	28,6	26,5
	30/01/16 pm	27,8	23,5	36,8	28,5	28,3	27,1
	31/01/16 am	27,3	27,9	27,9	27,9	24,2	-
	31/01/16 pm	27,9	23,8	36,1	17,4	28,1	26,7
	01/02/2016	30,3	25,2	-	30,3	28,5	27,4
2	02/02/2016	28,1	22,6	36,8	29,3	26,3	26,4
	03/02/2016	29,8	24,6	36,5	29,6	27,8	27,2
	08/02/2016	28,2	24,8	38,8	29,4	29,1	26,6
	09/02/16 am	31,4	22,8	35,5	29,5	26	26,3
	09/02/16 pm	29,3	26	37,1	29	29,7	26,8
	10/02/2016	28,7	25,6	37,1	28,2	30,3	28,4
	11/02/16 am	30,1	24,7	38	30,1	28,5	27,5
	11/02/16 pm	28,2	24,7	-	28,3	28	28,2
	12/02/2016	30,1	24,7	38,9	31	27,9	26,7
	13/02/2016	29,6	22	36,4	29,7	25,6	26,2
	15/02/2016	28,9	25,6	36,2	29	29,4	25,9

Pour l'opérateur 1, la reproductibilité du pooling au rang 9/10 et de l'échantillon 1601126192PJ au rang 9/10 pour la détection de *M. genitalium*, ont donné des résultats

acceptables.

Dans la reproductibilité de l'opérateur 2, le pooling 9/10 de *M. genitalium* (Rox) a été acceptable.

Au travers de ce tableau nous pouvons aussi approuver la concordance ou la satisfaction de la variabilité inter-opérateurs (**tableau IX**). D'après l'analyse des résultats, nous estimons soit 100% de conformité sur les contrôles positifs et négatifs, 100% de conformité sur Hex, 90% venant des deux opérateurs (op) soit 100% de conformité sur le pooling et 9/10 chez op1 et 10/10 chez op2 soit 90% de conformité.

Tableau IX: Variabilité inter-opérateurs

Échantillons	Opérateur 1			Opérateur 2		
	Fam	Hex	Rox	Fam	Hex	Rox
CTL-	100%	-	-	100%	-	-
CTL+	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Pooling PV	100%	100%	9/10	100%	100%	9/10
Échantillon x	100%	100%	9/10	100%	100%	10/10

1.3. La justesse les interférences et la contamination

- L'évaluation de la justesse a été faite sur la comparaison des méthodes.
- L'étude sur les interférences que nous avons testées sur la matrice spermatique a donnée des résultats positifs satisfaits. Nous pouvons dire qu'aucune inhibition n'a été observée lors de l'amplification.
- Sur l'étude de la contamination inter-échantillon nous avons observé une absence de contamination des échantillons négatifs intercalés entre les échantillons positifs lors de l'extraction automatisée sur deux séries.

2. Comparaison de la méthode AMPLIX et Cobas TaqMan

Dans notre étude, nous avons comparé AMPLIX à Cobas TaqMan qui était la méthode utilisée au laboratoire pour la recherche de *C. trachomatis*. Nous avons travaillé sur **128** échantillons dont **90** échantillons endocervicaux, **32** échantillons d'urines et **6** spermes (**tableau X**). À cet effet nous avons obtenu **32** soit 25% de positifs appelés "vrais positifs » sur les deux méthodes (27 échantillons positifs endocervicaux, 3 échantillons positifs d'urine et 2 échantillons positifs de sperme) et **95** soit 74,2% de négatifs ou "vrais négatifs" venant également des deux méthodes (63 négatifs endocervicaux, 28 négatifs d'urine et 4 négatifs de sperme).

Tableau X:Récapitulatif de % de positifs des différents prélèvements

Échantillons n=128	Nombre de positifs	%
Endocervicaux n=90	27	30%
Urines n= 32	3	9,3%
Spermes n= 6	2	33,3%

Lors de l'amplification, deux échantillons endocervicaux sont sortis négatif avec la méthode Amplix mais positif avec Cobas TaqMan. Ils ont été appelés "faux négatifs". Ces deux échantillons endocervicaux ont donné des cycles d'apparition du signal des valeurs supérieures à 39. Nous avons refait l'amplification sur TaqMan qui a donné des résultats concordant avec celui de AMPLIX. Cette discordance a donc été résolue après avoir retesté les échantillons voir **tableau XI**.

Au niveau des urines et des spermes, un échantillon n'a pas été contributif, il a subi une inhibition lors de l'amplification avec Cobas TaqMan et, passée sur AMPLIX, il a donné un résultat négatif. Ainsi, il n'a pas été pris en compte dans la comparaison.

La valeur prédictive positive (VPP) est de 100% et la valeur prédictive négative (VPN) est de 100% pour les urines et les spermes.

La sensibilité diagnostique était de 100%, la spécificité diagnostique était de 100% et le pourcentage de corrélation entre les deux méthodes était de 100% (**tableau XII**).

Du point de vu de la Justesse (**voir tableau XIII**) après comparaison des deux méthodes, les résultats ont été satisfaisants car nous avons observé une concordance parfaite entre les deux méthodes. Le nombre d'échantillons répétés sur AMPLIX est en accord avec la valeur de référence (Cobas TaqMan).

Dans cette étude qualitative les valeurs du % de corrélation est de 100%, ce qui signifie que les performances de AMPLIX se superposent à celles du Cobas TaqMan.

Tableau XI: Résumé des résultats du test AMPLIX comparés à ceux du test Cobas TaqMan CT, v2.0 sur des échantillons endocervicaux après résolution des faux négatifs.

Ensemble des échantillons endocervicaux N=90		Test Cobas TaqMan		
		Positifs	Négatifs	Total
Test AMPLIX	Positifs	27	0	27
	Négatifs	0	63	63
	Total	27	63	90

Sensibilité diagnostique = $(27/27) \times 100 = 100\%$

Spécificité diagnostique = $(61/61) \times 100 = 100\%$

% de corrélation = $((27+63)/90) \times 100 = 100\%$

Tableau XII:Résumé des résultats du test AMPLIX comparé à ceux du test Cobas TaqMan CT, v2.0 sur des échantillons d'urine et de sperme

Ensemble des échantillons d'urine et sperme N=37		Test Cobas TaqMan		
Test AMPLIX		Positifs	Négatifs	Total
	Positifs	5	0	5
	Négatifs	0	32	32
	Total	5	32	37

Sensibilité diagnostique = $(5/5) \times 100 = 100\%$

Spécificité diagnostique = $(32/32) \times 100 = 100\%$

% de corrélation = $((5+32)/37) \times 100 = 100\%$.

Tableau XIII:Résultats sur la Justesse

Échantillons	Nombre valeurs (N)	de TaqMan	AmpliX
Écouvillons +	27	27	27
Écouvillons -	63	63	63
Urines +	3	3	3
Urines -	28	28	28

Au travers de tous les paramètres observés, nous avons conclu que la comparaison entre

ces deux méthodes a été satisfaisante et elle montre une concordance de 100%.

3. Documentation de la présence de *M. genitalium* sur des échantillons urogénitaux.

Après la validation de la méthode AMPLIX, nous avons analysé un certain nombre d'échantillons dans le but de documenter l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons analysés en routine.

Les prélèvements provenant des patients étaient destinés à être analysé sur AMPLIX sur la demande spécifique du médecin pour la recherche de *C. trachomatis*. Par son côté avantageux et dans l'intérêt de notre étude, nous avons combiné la recherche de *C. trachomatis* à celle de *M. genitalium*.

3.1. Résultats de la détection de *M. genitalium* et *C. trachomatis*

Au total 592 extraits d'ADN ont été amplifiés et repartis en 499 écouvillons endocervicaux, 63 prélèvements d'urine du premier jet et 30 prélèvements de sperme. Après amplification, 21 (3,5%) échantillons étaient positifs. L'ADN de *M. genitalium* a été détecté chez 11 (1,8%) patients et 10 (1,6%) patients ont été positifs à *C. trachomatis*.

Sur les 11 patients positifs à *M. genitalium*, 4 prélèvements endocervicaux, 6 prélèvements d'urines du premier jet et 1 du sperme.

Sur les 10 patients positifs à *C. trachomatis* il y'avait 8 prélèvements endocervicaux, 1 sperme et 1 urine du premier jet.

Tableau XIV: Récapitulatifs des résultats positifs associés aux milieux de prélèvement

	<i>M. genitalium</i>	<i>C. trachomatis</i>
Prélèvements endocervicaux	4	8
Prélèvements d'urine	6	1
Prélèvements de sperme	1	1

Parmi les 592 extraits d'ADN, nous avons observé 3 inhibitions soit 2 prélèvements de spermes et 1 prélèvement endocervical. L'amplification de ces prélèvements a été refait sauf pour les spermes à cause de la quantité d'aliqots insuffisante.

La plupart des prescriptions ne mentionnaient les informations cliniques des patients. Parmi les renseignements cliniques obtenus, on pouvait distinguer une urétrite, une vaginite, leucorrhée, dysurie et des brulures mictionnelles, douleurs pelviennes. Aucune co-infection n'a été observée entre les deux germes, cependant nous avons observé la présence d'autres germes associés à ces infections tels que *N. gonorrhoeae* (associé à *C. trachomatis* et pas à *M. genitalium*), *U. urealyticum* *Gardnerella vaginalis*, *Canidida albicans*, *Candida glabrata*, *Trichomonas vaginalis*.

3.2. Crossing Point et le nombre de cycles

Parmi les résultats positifs précoces, nous avons eu une fluorescence au cycle 18. Ceci signifie que l'échantillon contient une charge élevée de l'extrait d'ADN du pathogène. Cependant nous avons observé deux résultats positifs avec une fluorescence au cycle 40 et 44, ces échantillons ont été refaits et ont donné par la suite des résultats négatifs.

3.3. Relation entre l'état de la flore vaginal,

Nous avons croisé la présence de *C. trachomatis* ou de *M. genitalium* avec le type de flore vaginale.

La flore vaginale des patients infectés variait entre le type I et le type IV. Sur les 10 prélèvements vaginaux positifs à *M. genitalium* ou *C. trachomatis*, 5 provenaient d'une flore normale (type I ou type II). Ces données sont en faveur d'un portage asymptomatique.

Nous avons obtenu 4 prélèvements vaginaux issus d'une flore de type IV avec la présence d'un coccobacille Gram négatif, *G. vaginalis*.

DISCUSSION

Le diagnostic des IST par des méthodes fiables constitue un impératif important pour la lutte contre leur propagation.

La validation des méthodes dans un LBM est une approche permettant de garantir la fiabilité des résultats.

Cette validation devant se baser sur des exigences d'un référentiel (**Norme Internationale ISO 15189, 2012**) et/ou d'un guide international

(<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>).

M. genitalium est un agent bactérien responsable des IST dont le diagnostic par biologie moléculaire se fait rarement dans les LBM soit par manque d'équipements soit par le fait que *M. genitalium* n'étant pas considéré comme un pathogène spécifique.

De nombreuses études ont permis de montrer l'implication de *M. genitalium* comme agent bactérien d'IST (**101**) et la nécessité d'utiliser la biologie moléculaire par amplification génique comme méthode recommandée (**61**).

La validation de AMPLIX a été réalisée avec détermination des caractéristiques de performance.

Pour le diagnostic de *C. trachomatis*, AMPLIX a montré une parfaite concordance avec COBAS TaqMan.

La répétabilité et la reproductibilité effectuées avec les échantillons et le matériel de contrôle ont été satisfaisantes.

La sensibilité et la spécificité diagnostique en comparaison avec COBAS TaqMan sont de 100%. Des études de comparaison ont montré des résultats comparables avec COBAS TaqMan et d'autres tests (**18**).

La validation de *M. genitalium* a été effectuée avec les mêmes échantillons que pour *C. trachomatis*. L'absence de test de *M. genitalium* sur COBAS TaqMan n'a pas permis

de faire la comparaison des méthodes.

La validation a été faite sur les critères de performance (répétabilité et reproductibilité), les résultats obtenus ont été acceptables pour les échantillons utilisés.

Pour les échantillons d'écouvillons endocervicaux, la répétabilité était de 93,75% et la reproductibilité de 90,5%.

Pour les urines du premier jet, la reproductibilité était de 95%.

Les séries dont *M. genitalium* n'a pas été amplifié peuvent être justifiées par deux hypothèses :

- ✓ Erreurs aléatoires
- ✓ Charge bactérienne basse dans les aliquotes concernées

L'hypothèse de l'erreur aléatoire peut être exclue par le fait qu'aucun cas d'absence d'amplification n'a été observé lors de la reproductibilité avec le matériel de contrôle. De même les épreuves de l'effet de la matrice avec 42 échantillons de spermes inoculés avec un même échantillon positif à la fois *C. trachomatis* et *M. genitalium* n'a pas montré une absence d'amplification de *M. genitalium*.

L'hypothèse de la charge bactérienne basse est soutenue par le nombre de cycles d'apparition du signal qui sont plus élevé (jusqu'à 38) que ceux observé avec *C. trachomatis* (≤ 30).

Cette charge bactérienne basse peut donc justifier l'absence d'ADN cible dans la prise d'essai de l'éluat d'extraction lors de l'amplification.

Pour augmenter le nombre d'aliquotes afin de pouvoir réaliser toutes les épreuves de performance, le pooling des échantillons endocervicaux ou encore les urines du premier jet ont été aliquotés par 100 μ L. Pour constituer la prise d'essai de l'extraction (400 μ L), ces aliquotes ont été donc diluées au 1/4. Cette dilution contribue également à la diminution de la charge bactérienne dans la prise d'essai.

La reproductibilité avec le matériel de contrôle (contrôle négatif et positif) a été satisfaisante aussi bien pour *C. trachomatis* que pour *M. genitalium*.

Le choix des échantillons pour la détermination des caractères de performance à la place du matériel de contrôle comme recommandé par les guides du COFRAC (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04> et

[http://www.cofrac.fr/documentation/SH GTA 06](http://www.cofrac.fr/documentation/SH_GTA_06)) est dû au fait que l'échantillon du patient contient les bactéries entières et donc permet :

- ✓ De contrôler toute l'étape de l'extraction (réactifs et automate)
- ✓ D'avoir une vraie appréciation de l'interaction du système d'amplification avec la séquence cible naturelle de la bactérie.

Toute PCR possède deux limites : les faux positifs par contamination, les faux négatifs par inhibition.

L'épreuve de contamination n'a pas montré de contamination inter-échantillon malgré l'alternation des échantillons positifs et négatifs.

Ce résultat est la résultante des dispositions prises dans la conception de l'automate d'extraction avec :

- ✓ Une lame anti contamination se déplaçant sous les embouts de prélèvement avec le bras mobile de l'extracteur empêchant la contamination des puits de boîtes tampon d'extraction et de lavage.
- ✓ Un couvercle anti-projection protégeant les tubes d'élution de la contamination inter-échantillon.
- ✓ Une étape de stérilisation obligatoire avec une rampe UV pendant 15 min.

L'aptitude de AMPLIX à se débarrasser des inhibiteurs a été vérifiée avec les échantillons de sperme qui sont sensés contenir le plus d'inhibiteurs, aucune inhibition

n'a été observée sur les 42 échantillons de sperme inoculés avec 100 µL d'un échantillon positif.

Cette absence d'inhibition est due au système d'extraction de AMPLIX utilisant des particules magnétiques de silice avec une plaque aimantée permettant de retenir sélectivement l'ADN cible fixé à la silice et éliminant les inhibiteurs avec les autres composants cellulaires.

Sur les 592 échantillons amplifiés lors de l'étude de la documentation de l'existence de *M. genitalium*, seulement 03 inhibitions ont été observées soit 0,5%. Ce taux faible est nettement meilleur à celui habituellement observé au LBM BIO 24 (données non publiées). Ce faible taux d'inhibition présente un avantage dans le respect des délais de rendu des résultats car toute inhibition entraîne souvent un report de la mise à disposition des résultats.

La variabilité inter-opérateur sur les mêmes échantillons a montré des résultats identiques. Ce résultat montre bien la robustesse de AMPLIX par ses composants automatiques laissant peu de place à l'intervention manuelle qui ne se résume< qu'à la distribution de l'échantillon pour l'extraction ou à la distribution de l'éluât pour l'amplification.

L'étude de la documentation de *M. genitalium* a été effectuée avec 592 échantillons, 21 échantillons étaient positifs soit 3,5% dont 10 (1,6%) pour *C. trachomatis* et 11 (1.8%) pour *M. genitalium*.

Aucune double infection n'a été observée sur les 592 échantillons amplifiés.

Les cas de *M. genitalium* détectés dans les urines du premier jet n'étaient pas associés avec la présence de *N. gonorrhoeae*, il s'agissait donc d'urétrite non gonococcique et sans *C. trachomatis* et avec signes cliniques. Ces observations corrélerent avec certaines études (100, 59). Ces associations *M. genitalium* et urétrite ont été observées dans d'autres études (10).

Sur les 31 échantillons positifs pour *C. trachomatis* détectés par COBAS TaqMan et utilisés pour la comparaison, 04 échantillons étaient positifs à la fois à *C. trachomatis* et *M. genitalium*.

Durant l'année 2015, sur 1906 demandes de *C. trachomatis* reçues au LBM BIO 24, 51 échantillons étaient positifs soit 2,67% (données non publiées), on peut donc estimer le même taux pour *M. genitalium* d'après ces résultats préliminaires.

L'association entre *M. genitalium* et les autres germes ne permet pas de faire des observations du fait d'un effectif réduit de cas positif.

Sur les échantillons positifs obtenus avant troncature, nous avons observé que certains échantillons avaient l'apparition du Crossing Point à partir du 40^{ème} cycle. Après réanalyse, ces échantillons étaient négatifs.

Ainsi lors de la validation technique des résultats, toute amplification positive après le 39^{ème} cycle doit être repris pour confirmation.

Ces cas peuvent être dus soit à une charge bactérienne basse, soit à une dénaturation des amorces **(89)** avec libération de l'inhibiteur ce qui permet l'émission de la fluorescence du fluorophore tel que décrit dans le principe de la méthode.

Bien que le dosage de la sensibilité et la spécificité sont des considérations importantes lors de l'évaluation de la fiabilité du test, des critères supplémentaires tels que l'applicabilité, la facilité d'utilisation, le temps de traitement et les coûts ne devraient pas être négligés. Le test AmpliX a montré une séquence de flux de travail simple. Il donne des résultats rapides et spécifiques validés par l'utilisation d'une amplification du contrôle interne. La facilité d'utilisation de la préparation de l'échantillon automatique et le flux de travail rapide sont également propices à l'efficacité de la manipulation au laboratoire. Le temps des résultats est d'environ 3h avec une

extraction automatique de 1h 40min et d'une amplification de 1h 30min. C'est à noter que l'étape d'extraction manuelle est un point faible du test MG Bio-Rad Dx CT / NG et prend du temps. En conséquence, la facilité de collecte d'échantillons rend ce test attrayant pour les cliniques comme un test de dépistage pour les patients symptomatiques et asymptomatiques.

CONCLUSION

Les IST constituent mondialement un problème majeur de santé publique avec une incidence de 357 millions de cas par an. L'absence d'outil adéquat de diagnostic est souvent l'origine des complications et de séquelles graves notamment l'infécondité.

Dans la lutte contre ces infections, le LBM joue un rôle très important, celui du diagnostic biologique avec l'utilisation des méthodes de référence recommandées par les sociétés savantes.

L'utilisation des tests de biologie moléculaire par amplification génique est une forte recommandation par plusieurs sociétés savantes pour le diagnostic des IST à *C. trachomatis* et *M. genitalium*.

M. genitalium est un agent bactérien responsable des IST comme le montre de nombreuses études. Il occupe de plus en plus une place importante dans le rang des agents bactériens responsables des IST. De plus son diagnostic est essentiellement moléculaire.

En Afrique et particulièrement au Sénégal, l'absence de test de dépistage de *M. genitalium* dans les LBM est à l'origine de l'absence des données épidémiologiques et de la responsabilité de cette bactérie dans certaines IST telles que les urétrites non gonococciques et non chlamydia.

Dans le but d'élargir son plateau technique, le LBM BIO 24 a acquis un nouvel automate pour renforcer le diagnostic moléculaire par PCR en temps réel.

Pour répondre aux exigences de la norme ISO 15189, nous avons entrepris ce travail afin de valider sur site le nouvel automate AMPLIX de BIOSYNEX conformément aux recommandations de SH GTA 04 et de documenter l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons cliniques.

C'est dans ce cadre que nous avons entrepris ce travail dont :

L'objectif général est la validation de l'automate AMPLIX de BIOSYNEX pour la

détection de *C. trachomatis* et *M. genitalium* par PCR en temps réel conformément aux recommandations de la norme ISO 15189 et de SH GTA 04.

Les objectifs secondaires étaient :

- ✓ De déterminer les performances analytiques de AMPLIX
- ✓ Comparer AMPLIX avec Cobas TaqMan de ROCHE DIAGNOSTICS pour la détection de *C. trachomatis* par PCR en temps réel
- ✓ Documenter l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons utilisés pour la recherche de *C. trachomatis* en routine.

Notre étude s'est ouverte sur deux volets :

- Le 1er volet a porté sur la validation de la nouvelle technique instaurée au laboratoire Bio 24. Il a inclus la comparaison de cette méthode avec celle de référence et l'étude des critères de performance.
- Le 2ème volet a porté sur l'analyse des échantillons par AmpliX pour la détection de *C. trachomatis* et *M. genitalium*.

Les prélèvements utilisés proviennent d'une population venue pour des analyses spécifiques dont la demande est la recherche de *C. trachomatis*.

Les critères de performance recommandés par le SH GTA 04 (répétabilité et reproductibilité) ont été effectués de même que la comparaison de AMPLIX avec COBAS TaqMan pour le diagnostic de *C. trachomatis* par PCR.

Pour *C. trachomatis*, les résultats de la répétabilité et de la reproductibilité ont montré une performance satisfaisante de 100%.

La comparaison avec le COBAS TaqMan a donné une sensibilité et une spécificité diagnostique de 100% permettant de conclure aux performances superposables des

deux systèmes de diagnostic.

Pour *M. genitalium*, la répétabilité et la reproductibilité ont montré des résultats acceptables respectivement de 93,75% et de 95% pour la répétabilité et la reproductibilité.

L'étude de la contamination effectuée avec des échantillons positifs et négatifs alternés, la reproductibilité avec le matériel de contrôle et la corrélation inter-opérateur ont montré des résultats satisfaisants aussi bien avec *C. trachomatis* qu'avec *M. genitalium* démontrant ainsi la robustesse de ce système analytique.

Pour documenter l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons cliniques, 592 échantillons ont été analysés pour la recherche de *C. trachomatis* et *M. genitalium*.

Au total, 21 échantillons ont été trouvés positifs soit 3.5% dont 10 *C. trachomatis* (1,6%) et 11 *M. genitalium* (1,8%). *C. trachomatis* et *M. genitalium* ont donc été retrouvés à des proportions identiques. Aucun cas de co-infections n'a été décelé.

Dans ces isolats l'isolement de *M. genitalium* a été associé à des signes cliniques.

Enfin, une relation entre l'état de la flore vaginale, *M. genitalium* et *C. trachomatis* a été effectuée sur les prélèvements positifs pour pouvoir confirmer le lien entre le déséquilibre de la flore et la présence des germes responsables d'IST.

PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

Malgré la petite taille de l'échantillon, ces données montrent bien l'existence de *M. genitalium* dans les échantillons. Il paraît donc nécessaire d'effectuer des études plus complètes et à large échelle en collaboration avec des cliniciens pour :

1. Obtenir des données épidémiologiques dans les différents types de populations ;
2. Déterminer l'association *M. genitalium* et les différents signes cliniques ;
3. Connaître l'estimation des profils de sensibilité aux antibiotiques après contrôle ;
4. Faire des prestations de conseil : information aux prescripteurs de la disponibilité du test et de l'existence de *M. genitalium* comme agent bactérien des IST à Dakar.

L'isolement de *M. genitalium* au même taux que *C. trachomatis* suggère de reconsidérer ce germe avec autant d'importance que *C. trachomatis* lors des bilans urologiques et gynécologiques avec recherche d'agents bactériens responsables de IST.

REFERENCES

1. Anagrus C, Lore B, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission. Sex Transm Infect 2005; 81(6):458–62.
2. Ankum WM, Mol BW, Van Der Veen F, Bossuyt PM. Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis. Fertil Steril 1996; 65:1093–9.
3. Avril Jean-loup, Henry Dabernat, François Denis, Henri Monteil. Bactériologie clinique 3e édition. Ellipses.2000.
4. Baehr, W, Zhang Y. X., Joseph T., Su H., Nano E. F., Everett E. D. K., and Caldwell D. H.. Mapping antigenic domains expressed by Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA1988; 85:4000-4004.
5. Bal François, *Chlamydia trachomatis* dans les infections sexuellements transmissibles, Thèse Pharmacie, Nancy, 2004 ; D3 30262
6. Barnes RC, Roddy RE, Stamm WE. Serovars of Chlamydia trachomatis causing repeated infection. In: Oriel D, Ridgway G, Schachter J, Taylor-Robinson D, Ward M, eds. Chlamydial infections. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1986:503–7.
7. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol Rev 1994; 58:686–99.
8. Bébéar CM, de Barbeyrac B, Pereyre S, Renaudin H, Clerc M, Bébéar C. Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas Ureaplasma spp.,

Mycoplasma hominis and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. Clin Microbiol Infect 2008; 14(8):801–5.

9. Bébéar CM. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*. In: Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. L'antibiogramme. Paris: ESKA; 2012. p. 589–600.
10. Bjornelius, E., Lidbrink, P. & Jensen, J. S. *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis – a study in Swedish male STD patients. 2000; Int J STD AIDS 11, 292–296.
11. Bianchi A, Ebel A., Cessot G. Diagnostic biologique des infections à *Chlamydia trachomatis*: données pratiques actuelles et perspectives en santé publique. La Lettre du Gynécologue, 1999; n° 246
12. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997; 10:160–84.
13. Bradshaw CS, Jensen JS, Tabrizi SN, Read TR, Garland SM, Hopkins CA, et al. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. Emerg Infect Dis 2006; 12(7):1149–52.
14. Cazanave C, L.E. Manhart, C. Bébéar. *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen. Médecine et maladies infectieuses 42 (2012) 381–392.
15. Campbell LA, Patton DL, Moore DE, Cappuccio AL, Mueller BA, Wang SP. Detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in women with tubal infertility. Fertil Steril 1993; 59:45–50.

16. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection and disease. *Infect Immun* 2000;68:6511–8.
17. Cisse Cheikh. Détermination de la prévalence des infections à Chlamydia et Neisseria gonorrhoeae en zone rurale (NIAKHAR) par la technique Amplicor. Thèse Pharmacie, Sénégal, 2002; n°72.
18. Chloé Le Roy, Isabelle Le Hen d, Maïthé Clerc, Véronique Arfel, Françoise Normandin, Cécile Bébéar, Bertille de Barbeyrac. The first performance report for the Bio-Rad Dx CT/NG/MG assay for simultaneous detection of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium in urogenital samples. *Journal of Microbiological Methods* 89 (2012) 193–197.
19. Chloé Le Roy, Sabine Pereyre, Cécile Bébéara. Evaluation of Two Commercial Real-Time PCR Assays for Detection of Mycoplasma genitalium in Urogenital Specimens. Volume 52. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014; p. 971–973.
20. Clausen HF, Fedder J, Drasbek M, Nielsen PK, Toft B, Ingerslev HJ, et al. Serological investigation of Mycoplasma genitalium in infertile women. *Hum Reprod* 2001; 16(9):1866–74.
21. COFRAC. Guide Technique D'accréditation de Vérification (portée A) / Validation (portée B) des Méthodes en Biologie Médicale. Document SH GTA 04 Révision 01. 2012.
22. COFRAC. Guide Technique D'accréditation : Contrôle de Qualité en Biologie Médicale. SH GTA 06 Révision 00. 2012.

- 23.Corsaro. D, LE Faou. A. Chlamydia. Ed. Tec et Doc. 2002.
- 24.Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, Astete S, Brunham RC, Holmes KK, et al. Association between Mycoplasma genitalium and acute endometritis. Lancet 2002;359(9308):765–6.
- 25.Cohen CR, Mugo NR, Astete SG, Odondo R, Manhart LE, Kiehlbauch JA, et al. Detection of Mycoplasma genitalium in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. Sex Transm Infect 2005; 81(6):463–6.
- 26.Coste J, Job-Spira N, Fernandez H, Papiernike, Spira A. Risk factor for ectopic pregnancy: a case- control study in France, with special focus on infections factors. Am J Epidemiol 1991; 133:839–49.
- 27.Daoudi-Hamdad F, Eb F, Orfila J. Diagnostic d’une infection génitale à Chlamydia trachomatis. Étude de la sensibilité du Système PACE 2CT vs culture. Option/Bio 1995; 127:7.
- 28.De Barbeyrac B, Bebear CH. Chlamydia. In: Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. Précis de Bactériologie Clinique. Paris: Editions ESKA; 2000. p. 1663–74.
- 29.De Barbeyarc B, Bébéar C, Géniaux M. Maladie de Nicolas et Favre. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, 8-076-A-10, 2001;6 p.
- 30.De Barbeyarc B, O. Peuchant, C. LE Roy, M. Clerc, L. Imouga, C. Bébéar, Infection à Chlamydia: Quoi de neuf? Edition feuillet de Biologie, VOL LIII N° 306 - MAI 2012

31. Dean D, Suchlandt RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by *omp1* genotyping. *J Infect Dis* 2000; 182:909–16.
32. Edward DG, Freundt EA; The classification and nomenclature of organisms of pleuropneumonia group. *J. Gen. Microbiol.* 1956; 14(1):197–207.
33. Edward D.G et Freundt F.A. Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *Int J Syst Bacteriol.* 1967; 17(3):267–268.
34. Eisenberg LG, Wyrick PB. Inhibition of phagolysosome fusion is limited to *Chlamydia psittaci*-laden vacuoles. *Infect Immun* 1981; 32:889-896.
35. Everett. K, Bush. P, Andersen. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1999; 49: 415-440.
36. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Infect* 2005; 81(1):73–8.
37. Friis RR. Interaction on L cells and *Chlamydia psittaci*. Entry of the parasite and host responses to its development. *J Bacteriol* 1972; 110:706-721.
38. Follmann, Frank et al. “Antigenic profiling of *Chlamydia trachomatis*.” *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197: 897-905.

- 39.Frenay. J, Renaud. F, Hansen. W, Bollet. C. Précis de bactériologie clinique, Ed. Eska. 2000.
- 40.Gencay M, Koskiniemi M, Ammala P, et al. Chlamydia trachomatis seropositivity is associated both with stillbirth and preterm delivery. APMIS 2000; 108:584–8.
- 41.Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. Sex Transm Infect 1998; 74(Suppl 1):12–6.
- 42.Golstein JL, Anderson GW, Brown MS,. Coated pits vesicles and receptor-mediated endocytose.Nature 1979; 279:679-685.
- 43.Goulet V, De Barbeyrac B, Raherison S, Prudhomme M, Semaille C, Warszawski J. Prevalence of Chlamydia trachomatis: results from the first national population-based survey in France. Sex Transm Infect 2010; 86(4):263-70.
- 44.Graysnot JT, Wang SP, Yeh LJ, Kuo CC. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. Rev Infect Dis 1985; 7:717–25.
- 45.Gregory NW, Byrne GI, Gardner M, Moulder JW, Cytochalasin B does not inhibit ingestion of Chlamydia psittaci by mouse fibroblast (L celis) or mouse peritoneal macrophages. Infect Immun 1979; 25:463-466.
- 46.Griffin FM, Griffin JA, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. 2. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow derived lymphocytes. J Exp Med 1976; 144:788-809.

47. Guangming Zhong, Ronald E. Reid, and Robert C. Bruhnam. Mapping Antigenic Sites on the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* with Synthetic Peptides infection and immunity, May 1990, p. 1450-1455.
48. Haggerty CL, Totten PA, Astete SG, Lee S, Hoferka SL, Kelsey SF, et al. Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect* 2008; 84(5):338–42.
49. Hamdad-Daoudi F, Orfila J, Lefebvre JF, Sueur JM, EB F. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infection. In: Stary A, editor. Proceedings. Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research.. p. 306 Vienna, Austria, Esculapio, Bologna, 1996; (9) 11-14.
50. Hamdad-Daoudi F. Diagnostic d'une infection à *Chlamydia trachomatis*. Apport des techniques d'amplification génique. [Thèse de Science]. Université de Picardie. Faculté de Médecine d'Amiens. 2003. p. 1-232.
51. Hamdad F, Orfila J, Boulanger J.-C, F. Eb. Infections urogénitales féminines à *Chlamydia trachomatis*. Meilleures approches diagnostiques. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2004 (32)1064–1074.
52. Hatch TP, Miceli M, Sublett JE. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol.* 1986;165:379.
53. Haute Autorité de Santé. Diagnostic Biologique de l'infection à *Chlamydia trachomatis*. Service évaluation des actes professionnels juillet 2010.
54. Hayflick L. & Chanock, R.M. *Mycoplasma* Species of Man. *Bacteriol. Reviews* 1965;29(2):185–221.

55. Henry-Suchet J, Ardoin P, Catalan P, Coppin V, Bussiere A, De Brux J, et al. Salpingites infracliniques à *Chlamydia trachomatis* et stérilité tubaire (cultures et sérologie sur 146 cas. *Med Mal Infect* 1983;627–30.
56. Herierka E, Dhar J. Acute neonatal respiratory failure and *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Infect* 2001; 77:135–6.
57. Huppert JS, Mortensen JE, Reed JL, Kahn JA, Rich KD, Hobbs MM. *Mycoplasma genitalium* detected by transcription-mediated amplification is associated with *Chlamydia trachomatis* in adolescent women. *Sex Transm Dis* 2008; 35(3):250–4.
58. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with non-gonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis* 2008; 47(12):1546–53.
59. Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18(1):1–11.
60. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2):683–92.
61. Jensen, J. S., Uldum, S. A., Søndergard-Andersen, J., Vuust, J. & Lind, K. (). Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1991; 29, 46–50.

62. Job-Spira N, Collet P, Coste J, Bremond A, Laumon B. Facteurs de risque de la grossesse extra-utérine: résultats d'une enquête cas témoins dans la région Rhône-Alpes. *Contracept Fertil Sex* 1993; 21:307-12.
63. Jones RB, Ardery BR, Hin SL. Correlation between serum anti-chlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. *Fertil Steril* 1982; 38:553-8.
64. Jurstrand M, Jensen JS, Magnuson A, Kamwendo F, Fredlund H. A serological study of the role of *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease and ectopic pregnancy. *Sex Transm Infect* 2007; 83(4):319-23.
65. Klausner JD, McFarland W, Bolan G, Hernandez MT, Molitor F, Lemp GF, et al. Knock-knock: a population based survey of risk behavior, health care access, and *Chlamydia trachomatis* infection among low-income women in the San Francisco area. *J Infect Dis* 2001; 183:1087-92.
66. Kovacs L, Nagy E, Berbik I, et al. The frequency and the role of *Chlamydia trachomatis* infection in premature labor. *Int J Obstet Gynecol* 1998; 62:47-54.
67. Krohn MA, Hillier SL, Bell TA, Krommal RA, Grayston JT. The bacterial etiology of conjunctivitis in early infancy. Eye prophylaxis study group. *Am J Epidemiol* 1993; 138:326-32.
68. Kuo CC. Culture of *Chlamydia trachomatis* in mouse peritoneal macrophages: factors affecting organism growth. *Infect Immun* 1978; 20:439-445.
69. Kuon W, Holzhütter HG, Appel H, Grolms M, Kollnberger S, Traeder A, et al. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J Immunol* 2001; 167:4738-46.

70. Lehtinen M, Paavonen J. Heat-shock protein in the immunopathogenesis of chlamydial pelvic inflammatory disease. In: Orfila J, Byrne GI, Chernesky MA, Grayston JT, Jones RB, et al., editors. "Chlamydial infection". Proceedings of the Eight International Symposium on Human chlamydial infections. 1994. p. 599–610.
71. Lucier, T. S., P.-Q. Hu, S. N. Peterson, X.-Y. Song, L. Miller, K. Heitzman, K. F. Bott, C. A. Hutchison III, and P.-C. Hu. Construction of an ordered genomic library of *Mycoplasma genitalium*. *Gene* 1994; 150:27–34.
72. Mahony JB, Chernesky MA. Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* for clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 22:865–7.
73. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* 2003; 187(4):650–7.
74. Manhart LE, Broad JM, Golden MR. *Mycoplasma genitalium*: should we treat and how? *Clin Infect Dis* 2011; 53(3):S129–42.
75. Mardh PA, Johansson H, Svenningsen N. Intrauterine lung infection by *Chlamydia trachomatis* in a premature infant. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73:569–72.
76. Moore DE, Foy HM, Daling JR, Grayston JT, Spadoni LR, Wang SP, et al. Increased frequency of serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertility due distal disease. *Lancet* 1982; 2:574–7.
77. Morowitz, H. J. The completeness of molecular biology. *Is. J. Med. Sci* 1984; 20:750–753.

78. Morrison RP. Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of γ -interferon. *Infect Immun* 2000; 6:6038–40.
79. Mutlu B, Mutlu N, Yucesoy G. The incidence of *Chlamydia trachomatis* in women with urethral syndrome. *Intern J Clin Practice* 2001; 55:525–6.
80. OMS. Stratégies de luttres contre les infections sexuellement transmissibles : 2006-2015 rompre la transmission, 2007; 72 : [http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/stis_strategy_fr\[1\].pdf](http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/stis_strategy_fr[1].pdf)
81. Paavonen J, Teisala K, Heinonen PK, Aine R, Laine S, Lethnen M, et al. Microbiological and histopathological findings in acute pelvic inflammatory disease. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94:454–60.
82. Painter RG, Whisenand J, McIntosh AT. Effect of cytochalasin B on actin and myosin association with particle binding sites in mouse macrophages. Implication with regard to the mechanism of action of cytochalasins. *J Cell Biol* 1981; 91:373-384.
83. Pépin, Labbé, Khonde, et al. *Mycoplasma genitalium*: an organism commonly associated with cervicitis among west African sex workers. *Sex Transm Infect* 2005; 81:67–72.
84. Perfettini JL, Darvillet T, Dautry-Varsat A, Rank RG, Ojcius DM. Inhibition of apoptosis by gamma interferon in cells and mice infected with *Chlamydia muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *Chlamydia trachomatis*). *Infect Immun* 2002;70:2559–65.
85. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotech* 2002; 2:2–11.

86. Punnonen R, Terho P, Nikkanen V, Meurman O. Chlamydia serology in fertile women by immunofluorescence. *Fertil Steril* 1970; 31:656–9.
87. Robert J. Bastidas, Cherilyn A. Elwell, Joanne N. Engel, and Raphael H. Valdivia. Chlamydial Intracellular Survival Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3:a010256
88. Rodolakis Annie. Propriétés Biologiques des Chlamydia. *Annales de Recherches Veterinaires*, INRA Editions, 1987, 18 (1), pp.19-27. <hal-00901685>
89. Sciboz Claude-Nathanaël. Développement et Validation de la Détection mycoplasma, ureaplasma et candida par PCR en temps réel. *Laboratoire MCL Niederwangen*. *ESanté*, 48ième volée. Avril – Aout 2009.
90. Stamm WE, Holmes KK. Chlamydial infections. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill 1991; 764–72.
91. Stamm WE. Chlamydia trachomatis - The persistent Pathogen Thomas Parran Award Lecture. *Sex Trans Dis* 2001; 28:684–9.
92. Stephens RS, Tam MR, Kuo CC, Nowinski RC. Monoclonal antibodies to *C trachomatis*: antibody specificity and antigen characterizations. *J Immunol*. 1982; 128:1083.
93. Stephens, R. S., R. Sanchez-Pescador, E. A. Wagar, C. Inouye, and M. S. Urdea. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. *J. Bacteriol*. 1987; 169:3879- 85.

94. Strirling P, Richmond S. The developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* in McCoy cells treated with cytochalasin. *J Gen Microbiol* 1977; 100:31-42
95. Sunil Sethi, Gagandeep Singh, Palash Samanta & Meera Sharma. *Mycoplasma genitalium*: An emerging sexually transmitted pathogen. *Indian J Med Res* 2012; 136 (12) 942-55.
96. Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility- a prospective study. *Fertil Steril* 2008; 90(3):513-20.
97. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24 (3):498-514.
98. Taylor-Robinson D, Thomas BJ. Laboratory techniques for the diagnosis of chlamydial infections. *Genitourin Med* 1991; 64:256-66.
99. Taylor-Robinson D. Genital chlamydial infections: Clinical aspects, diagnosis, treatment and prevention. In: Harris JRW, Forster SM, editors. *Recent Advances in Sexually Transmitted Diseases and AIDS*. Churchill Livingstone; 1991. p. 219-62.
100. Totten PA, Schwartz MA, Sjöström KE, Kenny GE, Handsfield HH, Weiss JB, Whittington WLH. Association of *Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. *J. Infect. Dis.* 2001; 183:269 – 276. <http://dx.doi.org/10.1086/317942>.
101. Tully JG, Taylor Robinson D, Rose DL, Cole RM, Bové JM. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int J Syst Bacteriol* 1983; 33(2):387-96.

102. Ward ME, Murray A, Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for Helacells: mechanisms of endocytosis. *J Gen Microbiol* 1984; 130:1765-1780.
103. Wager GP, Martin DH, Koutsky L, Eschenbach DA, Daling JR, Chiang WT, et al. Puerperal infections morbidity: relationship to route of delivery and to ante partum *Chlamydia trachomatis* infection. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 138:1028–33.
104. Weinstock H, Dean D, Bolan G. *Chlamydia trachomatis* infections. (Rev) *Infectious Disease Clinics of North America*. 1994; 8(4):797.
105. Weisburg, Tully, Petzel. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol*. 1989 Dec; 171(12): 6455–6467.
106. Weisburg W.G, Tully J. G, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrist, T. G. Lawrence, J. Van Etten, J. Maniloff, and C. R. Woese. A phylogenetic analysis of the mycoplasma: basis for their classification. *J. Bacteriol*. 1989; 171(12):6455-6467.
107. Wood GL, Bryan JA. Detection of *Chlamydia trachomatis* by direct fluorescent antibody staining. Results of the College of American Pathologists proficiency testing program, 1986-1992. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:483–8.
108. Workowski KA, Stevens CE, Suchland RJ, Holmes KK, Eschenbach DA, Pettinger MB, et al. Clinical manifestations of genital infection due to *Chlamydia trachomatis* in women: differences related to serovar. *Clin Infect Dis* 1994; 19:756–60.

109. World Health Organization. Sexually transmitted infections fact sheet. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>, accessed on August 25, 2011.
110. Yasuda M, Maeda S, Deguchi T. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycoplasma genitalium* and their bacteriological efficacy for treatment of M.
111. *genitalium*-positive non-gonococcal urethritis in men. Clin Infect Dis 2005; 41(9):1357–9.
112. Yechiel Becker. Chapter 39 Chlamydia. Medical Microbiology 4th edition. Baron S, editor. 1996.
113. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(4):1451–5.
114. Zhang WH, Wu YY, Fan SR. A prospective study of maternal-infant transmission of *Chlamydia trachomatis*. Zhonghera Yan Za Zhi 1994; 30:357–9.

SITES CONSULTÉS

Organisation mondiale de la santé :

[http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/stis_strategy_fr\[1\].pdf](http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/stis_strategy_fr[1].pdf). (consulté le 26-07-2016)

www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/fr/ (consulté le 16-07-2016)

Institut scientifique de santé publique

(www.wiv-isp.be/News/Documents/Rapport_IST_2013.pdf, (consulté le 26-07-2016).

European center for disease prevention and control:

<http://www.ecdc.europa.eu> (consulté le 18-11-2015).

IDEXX :

www2.idexx.com, (consulté le 16-07-2016)

Averting HIV and AIDs :

<http://www.avert.org/std-statistics-america.html> (consulté le 18-11-2015)

Comité Français d'Accréditation (COFRAC) :

<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04> (consulté le 18-07-2016)

<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06> (consulté le 18-07-2016)

www.cofrac.fr (consulté le 18-07-2016).

Roche molecular Diagnostic :

www.molecular.roche.com (consulté le 18-07-2016).

Campus de Microbiologie Médical

<http://www.microbes-edu.org/etudiant/chlamydia.html>; (consulté le 05-08-2016).

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

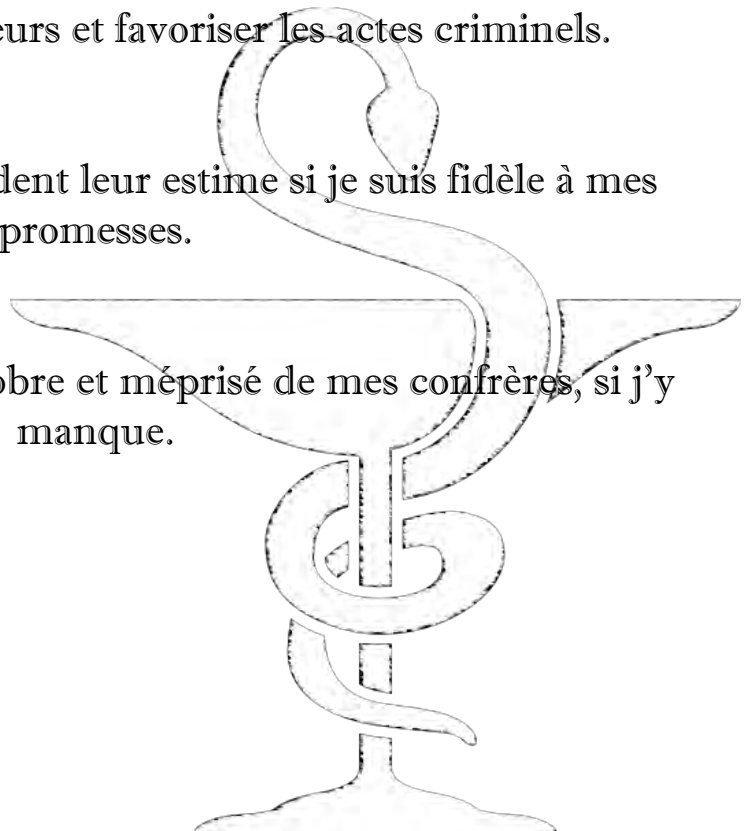


Table des matières

Dédicaces	i
Remerciements	iv
A nos maîtres et juges	vi
Liste des abréviations	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Sommaire	xv
INTRODUCTION	1
PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Chapitre 1: Généralités sur <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i>	4
<i>A/-Chlamydia trachomatis</i>	4
1. Taxonomie	4
1.1. Historique	4
1.2. Classification de la bactérie	5
2. Caractère bactériologique	6
2.1. Morphologie	6
2.2. Structures antigéniques	8
2.3. Variabilité antigénique	9
3. Cycle de développement	10
4. Pathogénie	11
4.1. Habitat et Mode de transmission	11
4.2. Physiopathologie	12
4.3. Facteur de virulence	15
5. Manifestations cliniques	16
5.1. Les infections génitales basses	17
5.1.1. Cervicites	17
5.1.2. Urétrites	17
5.2. Les infections génitales hautes	17
5.2.1. L'endométrite	17
5.2.2. Les salpingites	17
5.2.3. Syndrome de Fitz-Hugh-Curtis	18
5.2.4. Complications materno-fœtales	19
5.2.4.1 Complications au cours de la grossesse.	19
5.2.4.2 Conséquences de l'infection chez l'enfant.	19
5.3. La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)	20
5.4. La proctite	20
5.5. Syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter	20
5.6. Trachome	21
6. Épidémiologie	22
7. Diagnostic Biologique	24
7.1. Diagnostic direct	24
7.1.1. Prélèvements	24
7.1.2. Conditions de prélèvement	25
7.1.3. Méthodes directes de détection de <i>C. trachomatis</i>	25
7.1.3.1 La culture cellulaire	25

7.1.3.2 Tests de diagnostic rapides.	25
7.1.3.3 Techniques de biologie moléculaire.	27
7.2. Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique	29
8. Traitement	31
8.1. Sensibilité et résistance naturelle	31
8.2. Résistance acquise	32
B/- <i>Mycoplasma genitalium</i>	33
1. Taxonomie	33
1.1. Historique	33
1.2. Classification	35
2. Caractères Bactériologiques	35
2.1. Morphologie	35
2.2. Croissance	37
2.3. Métabolisme.	38
2.4. Structure antigénique	38
3. Pathogénie	39
3.1. Habitat	39
3.2. Physiopathologie	39
4. Manifestations cliniques	42
4.1. Infections génitales chez les hommes	43
4.1.1. Urétrite non gonococcique(UNG) aiguë	43
4.1.2. Urétrite non gonococcique chronique	44
4.1.3. Urétrite post-gonococcique	44
4.1.4. Balanoposthite	44
4.1.5. Prostatite et épididymite	44
4.2. Infections gynécologiques	44
4.2.1. Cervicite et urétrite	45
4.2.2. Infections génitales hautes	46
4.2.3. Conséquences obstétricales	47
4.2.4. D'autres localisations	48
5. Epidemiologie	48
6. Diagnostic	49
7. Le portage asymptomatique	50
8. Sensibilité et Traitement antibiotique	51
8.1. Résistance intrinsèque	51
8.2. Antibiotiques actifs	51
8.3. La résistance acquise	52

Chapitre 2: Validation de méthode selon les normes du COFRAC 53

1. La Répétabilité	53
2. La Contamination	54
3. Comparaison des méthodes	54
4. La Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)	55
5. Interférences et spécificité analytique	55
6. La Justesse	55

PARTIE II: TRAVAIL EXPERIMENTAL 57

Chapitre 1: Justificatif, objectifs et cadre de l'étude 58

1. Justification de l'étude	58
2. Objectifs de l'étude	59
2.1. Objectif général	59

2.2. Objectifs spécifiques	59
3. Cadre de l'étude : LBM BIO 24	59
Chapitre 2: Méthodologie.	61
1. Matériel et Réactifs	61
1.1. AMPLIX	61
1.2. COBAS TAQMAN	62
2. Echantillons et mode de recueil	64
3. Méthode de validation de AMPLIX	65
3.1. La répétabilité	66
3.2. La reproductibilité	66
3.3. La contamination inter-Echantillon	66
3.4. La variabilité inter-opérateur	67
3.5. Comparaison des méthodes (<i>Chlamydia trachomatis</i>) : AMPLIX vs TAQMAN	67
3.6. Sensibilité, spécificité, fidélité et justesse	67
3.7. Effet de la matrice avec les échantillons de sperme	68
4. Documentation de l'existence de <i>M. genitalium</i>	68
5. Principes des méthodes	69
5.1. AMPLIX	69
5.2. COBAS TAQMAN	70
6. Prétraitement des échantillons	71
Chapitre 3: Résultats	82
1. Évaluation des performances de la technique AMPLIX	82
1.1. La répétabilité	82
1.2. La Reproductibilité	86
1.3. La justesse les interférences et la contamination	89
2. Comparaison de la méthode AMPLIX et Cobas TaqMan	89
3. Documentation de la présence de <i>M. genitalium</i> sur des échantillons urogénitaux.	93
3.1. Résultats de la détection de <i>M. genitalium</i> et <i>C. trachomatis</i>	93
3.2. Crossing Point et le nombre de cycles	94
3.3. Relation entre l'état de la flore vaginal, <i>M. genitalium</i> et <i>C. trachomatis</i>	95
DISCUSSION	96
CONCLUSION	102
PERSPECTIVES ET RECOMANDATIONS	105
REFERENCES	106
Sites Consultés	121
Table des matières	124