

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Généralités sur les infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre I : Infections à <i>Chlamydia trachomatis</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>I. 1. Définition.....</b>	<b>5</b>
<b>I. 2. Historique.....</b>	<b>5</b>
<b>I. 3. Classification.....</b>	<b>5</b>
<b>I. 4. Caractères bactériologiques.....</b>	<b>6</b>
I. 4. 1. Morphologie, génome et cycle de développement.....	6
I. 4. 2. 1. Morphologie génome.....	6
I. 4. 2. 2. Cycle de développement.....	6
I. 4. 2. Caractères culturels.....	8
I. 4. 2. 1. Culture sur œuf embryonné.....	8
I. 4. 2. 2. Culture sur lignée cellulaire.....	8
I. 4. 3. Structure antigénique.....	9
I. 4. 3. 1. Antigènes de genre.....	9
I. 4. 3. 2. Antigènes d'espèces.....	9
I. 4. 3. 3. Antigènes spécifiques de types.....	9
I. 4. 4. Réponse immunitaire à <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	9
<b>I. 5. Localisation et épidémiologie.....</b>	<b>10</b>
I. 5. 1. Localisation.....	10
I. 5. 2. Epidémiologie.....	10
<b>I. 6. Pouvoir pathogène.....</b>	<b>10</b>
<b>I. 7. Manifestations cliniques.....</b>	<b>11</b>
I. 7. 1. Trachome.....	11
I. 7. 2. Infections uro-génitales.....	11
I. 7. 2. 1. Chez l'homme.....	11
I. 7. 2. 2. Chez la femme.....	11
I. 7. 2. 3. Complications générales.....	12
I. 7. 2. 4. Infections néonatales.....	12
I. 7. 3. Lymphogranulomatose vénérienne ou LGV.....	12
<b>I. 8. Diagnostic biologique.....</b>	<b>12</b>
I. 8. 1. Prélèvement.....	12
I. 8. 2. Examen direct.....	13
I. 8. 3. Culture.....	13

I. 8. 4. Sensibilité aux antibiotiques.....	13
I. 8. 5. Recherche d'anticorps sériques.....	13
<b>I. 9. Traitement et prévention.....</b>	<b>14</b>
I. 9. 1. Traitement.....	14
I. 9. 2. Prévention.....	14
<b>Chapitre II : Infection à <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>II. 1. Définition.....</b>	<b>15</b>
<b>II. 2. Historique.....</b>	<b>15</b>
<b>II. 3. Classification.....</b>	<b>15</b>
<b>II. 4. Caractères bactériologiques.....</b>	<b>15</b>
II. 4. 1. Morphologie et génome.....	15
II. 4. 2. Pathologie et cycle de développement.....	16
II. 4. 3. Caractères cultureux.....	18
II. 4. 4. Caractères biochimiques.....	19
II. 4. 5. Structure antigénique et facteurs de virulence.....	19
II. 4. 6. Réponse immune à <i>N. gonorrhoeae</i> .....	20
<b>II. 5. Localisation et épidémiologie.....</b>	<b>20</b>
II. 5. 1. Localisation.....	20
II. 5. 2. Epidémiologie.....	20
II. 5. 2. 1. Transmission.....	20
II. 5. 2. 2. Incidence et prévalence.....	20
<b>II. 6. Pouvoir pathogène.....</b>	<b>21</b>
<b>II. 7. Manifestations cliniques.....</b>	<b>20</b>
II. 7. 1. Chez l'homme.....	21
II. 6. 2. Chez la femme.....	21
II. 7. 3. Chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes.....	21
II. 7. 4. Complications générales.....	22
<b>II. 8. Diagnostic biologique.....</b>	<b>22</b>
II. 8. 1. Prélèvement.....	22
II. 8. 2. Examen direct.....	22
II. 8. 3. Sensibilité aux antibiotiques.....	23
II. 8. 4. Diagnostic immunologique.....	23
<b>II. 9. Traitement et prévention.....</b>	<b>23</b>
II. 9. 1. Traitement.....	23

II. 9. 2. Prévention.....	24
<b>Chapitre III. Diagnostic moléculaire des infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>III. 1. Hybridation moléculaire.....</b>	<b>25</b>
III. 1. 1. Détection des ARNr de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	25
III. 1. 2. Détection de l'ADN de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	25
<b>III. 2. Techniques utilisant l'amplification de l'ADN.....</b>	<b>25</b>
III. 2. 1. La ligase Chain Reaction (LCR.).....	25
III. 2. 2. La Transcription Mediated Amplification (TMA).....	25
III. 2. 3. La Polymerase Chain Reaction (PCR).....	26
III. 2. 3. 1. Historique de la PCR.....	26
III. 2. 3. 2. Principe de la PCR.....	26
III. 2. 3. 2. 1. Composés utilisés en PCR.....	26
III. 2. 3. 2. 2. Différentes étapes de la PCR.....	26
III. 2. 3. 2. 3. PCR classique et PCR en temps réel.....	28
III. 2. 3. 2. 3. 1. Graphique de l'amplification par PCR en temps réel.....	28
III. 2. 3. 2. 3. 2. Exemple de détection par PCR en temps réel.....	29
III. 2. 3. 3. Cobas Amplicor des laboratoires Roches.....	30
III. 2. 3. 4. m2000 Abbott real time.....	30
<b>Travail personnel.....</b>	<b>31</b>
<b>Chapitre I : Cadre géographique, période et population d'étude.....</b>	<b>32</b>
<b>I. 1. Cadre géographique et période d'étude.....</b>	<b>30</b>
I. 1. 1. Enquête et prélèvements.....	32
I. 1. 2. Traitement des échantillons.....	32
<b>I. 2. Population d'étude.....</b>	<b>32</b>
<b>Chapitre II : Matériel et réactifs utilisés.....</b>	<b>34</b>
<b>II. 1. Matériel biologique.....</b>	<b>34</b>
<b>II. 2. Matériel et réactifs de laboratoire.....</b>	<b>34</b>
II. 2.1. Matériel pour la technologie Cobas Amplicor.....	34
II. 2. 2. Réactifs pour la technologie Cobas Amplicor.....	34
II. 2. 3. Matériel pour la technologie m2000.....	34
II. 2. 4. Réactifs pour la technologie m2000.....	34
<b>Chapitre III : Méthodes d'étude.....</b>	<b>35</b>
<b>III. 1. Population générale.....</b>	<b>35</b>

III. 1. 1 Accueil et enquête.....	35
III. 1. 2. Prélèvement, transport et conservation des échantillons.....	35
<b>III. 2. Travailleuses du sexe (TS) et hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (MSM).....</b>	<b>36</b>
<b>III. 3. Détection avec le Cobas Amplicor.....</b>	<b>36</b>
III. 3. 1. Principe du Cobas Amplicor.....	36
III. 3. 2. Mode opératoire.....	36
III. 3. 2. 1. Préparation des échantillons.....	36
III. 3. 2. 2. Préparation des contrôles.....	37
III. 3. 2. 3. Préparation du mélange réactionnel.....	37
III. 3. 2. 4. Préparation des cassettes.....	37
III. 3. 2. 5. Préparation de la solution de lavage.....	37
III. 3. 2. 6. Mise en plaque.....	37
III. 3. 2. 7. Transfert des couronnes A et des cassettes à l'analyseur Cobas Amplicor.....	37
III. 3. 3. Recherche de CT/NG par l'appareil.....	38
III. 3. 3. 1. Régions cibles.....	38
III. 3. 3. 2. Déroulement du test avec l'appareil Cobas Amplicor.....	38
III. 3. 3. 3. Contrôle de qualité interne.....	39
III. 3. 3. 4. Validité des résultats.....	39
III. 3. 3. 5. Interprétation des résultats.....	39
<b>III. 4. Détection avec le m2000 Abbott real time.....</b>	<b>40</b>
III. 4. 1. Principe du m2000.....	40
III. 4. 2. Mode opératoire.....	40
III. 4. 3. Recherche de CT/NG par PCR.....	42
III. 4. 3. 1. Régions cibles.....	42
III. 4. 3. 2. Déroulement du test avec le m2000.....	42
III. 4. 3. 3. Contrôle de qualité interne.....	42
III. 4. 3. 4. Validité des résultats.....	42
III. 4. 3. 5. Interprétation des résultats.....	43
<b>III. 5. Traitement des résultats.....</b>	<b>43</b>
III. 5. 1. Appréciation des tests.....	43
III. 5. 1. 1. Définitions.....	43
III. 5. 1. 2. Expressions littérales.....	44
III. 5. 2. Analyse statistique.....	44

<b>Chapitre IV : Résultats et discussion.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.1. Résultats.....</b>	<b>47</b>
IV. 1. 1. Résultats comparés sur les populations cibles.....	47
IV. 1. 2. Résultats de la détection par les deux techniques.....	49
IV. 1. 2. 1. Comparaison des résultats Cobas Amplicor/m2000 par population cible.....	49
IV. 1. 2. 2. Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection des CT/NG.....	51
IV. 1. 2. 3. Evaluation comparée sur les deux techniques.....	52
IV. 1. 3. Analyse statistique et calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives négative et positive.....	53
IV. 1. 3. 1. Calcul des valeurs moyennes de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative.....	57
IV. 1. 3. 2. Résumé des calculs.....	57
<b>IV. 2. Discussion.....</b>	<b>58</b>
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>63</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>65</b>

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

1. Par le jour Montant !
2. Et par la nuit quant elle couvre tout !
3. Ton Seigneur ne ta ni abandonnée, ni détesté.
4. La vie dernière t'est certes, meilleurs que la vie présente.
5. Ton Seigneur t'accordera certes Ses faveurs, et alors tu seras satisfait.
6. Ne t'a-t-Il pas trouvé orphelin ? Alors Il t'a accueilli !
7. Ne t'a-t-Il pas trouvé égaré ? Alors Il t'a guidé.
8. Ne t'a-t-Il pas trouvé pauvre ? Alors Il t'a enrichi.
9. Quant à l'orphelin, donc ne le maltraite pas.
10. Quant au demandeur, ne le repousse pas.
11. Et quant au bienfait de ton Seigneur, proclame le.

Coran, Sourate 93 ; AD-DOUHA (le jour montant), 11 versets : Pré-Hégire.

A mes Parents.

A mes Grands-Parents.

A ma famille.

A toutes les personnes à l'endroit desquelles je me dois d'exprimer une reconnaissance éternelle.

Au nom d'ALLAH le Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

Paix et Salut à son Prophète Mohamed (PLS), Sceau des prophètes. Qu'ALLAH répande sa bénédiction et sa grâce sur lui, sa famille, ses compagnons et tous ceux qui suivent le droit chemin qu'il a tracé pour l'humanité.

Votre esclave vous rend grâce pour le secours permanent que vous ne cessez de lui apporter et implore votre bénédiction sur ce modeste travail que vous lui avez permis de réaliser.

Mes remerciements les plus sincères vont à l'endroit de toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ma formation intellectuelle, morale et spirituelle et qui se reconnaîtront à travers cette phrase. Mais qu'il me soit permis de citer ceux sans qui ce travail n'aurait jamais abouti à son terme.

Professeur Souleymane MBOUP

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de nous intégrer dans le laboratoire de bactériologie-virologie CHU Aristide Le Dantec pour ce travail.

Permettez nous cher professeur de vous exprimer notre profonde admiration et notre gratitude.

Professeur Ndèye Coumba TOURE KANE

Vous nous avez accueilli avec beaucoup de spontanéité dans votre laboratoire et confié ce travail.

C'est pour nous un grand honneur, un grand plaisir et un grand privilège d'avoir pu travailler à vos côtes. Votre disponibilité malgré vos nombreuses occupations a permis la réalisation de ce travail.

Soyez assuré cher professeur, de notre reconnaissance éternelle et de notre gratitude

Professeur Ngor FAYE.

C'est avec spontanéité et plaisir que vous avez accepté de nous encadrer pour ce travail.

Vos qualités intellectuelles et pédagogiques, votre disponibilité, votre modestie et votre générosité font de vous un professeur distingué.

Acceptez cher professeur nos sincères remerciements et notre gratitude.

Dr Halimatou DIOP NDIAYE.

Vous nous avez encadré et aidé à réaliser ce travail avec beaucoup de sacrifices. Nous avons beaucoup appris en travaillant à vos côtés.

Votre modestie et vos qualités humaines nourrissent en nous une grande estime. Votre courtoisie et votre rigueur dans le travail forcent l'admiration de tous ceux qui vous côtoient. C'est avec une grande joie et un immense plaisir que nous vous adressons nos sincères remerciements.

Trouvez ici l'assurance de notre profond respect.

Dr Ousmane SARR responsable de la section malaria de l'unité de biologie moléculaire

Pour l'attention particulière que vous portez à notre endroit.

Toute notre reconnaissance.

Dr Cheikh CISSE représentant du laboratoire Abbott et Dr Souleymane SOUMARE représentant du laboratoire Roches.

Pour votre soutien.

Toute notre reconnaissance.

Mr Ousmane DIOUF Statisticien au Laboratoire de Bactériologie-Virologie CHU Aristide Le Dantec et Mr Mamadou Thiam DIOP Professeur de statistique au département de biologie animale/ Faculté des Sciences et Techniques.

Vous nous avez beaucoup aidé dans l'analyse statistique des résultats.

Tous nos remerciements les plus sincères.

Toute l'équipe de l'unité de Biologie Moléculaire du Laboratoire de Bactériologie-Virologie.

Ndèye Aminata DIAW DIOUF, Oumy DIOP DIONGUE, Pape Moussa GUINDO, Sada DIALLO, Khady KEBE, Omar LY.

Pour votre aide, vos conseils et votre sympathie.

Toute ma reconnaissance.

Mme Fatou SYLLA THIAW et Astou de l'unité de Bactériologie

Pour les prélèvements chez la population générale

Mes très sincères remerciements

Mes aînés de l'unité de Biologie Moléculaire

El'Hadji Omar GUEYE, Nafissatou LEYE, Moussa THIAM, Nestor NGABA et Ambroise

Recevez mes très sincères remerciements.



Mes frères, nouveaux stagiaires de l'unité de Biologie Moléculaire

Mamadou Sambe YADE, Malick DIOUARA, Ouseynou NDIAYE, Edmond TCHIAKPE et Oulfata.

Tous mes encouragements.

Toute l'équipe de l'enquête nationale de surveillance combinée (2007).

Pour les prélèvements chez les TS.

Toute l'équipe de l'enquête sur les MSM (2007)

Pour les prélèvements chez les MSM.

Les groupes cibles

Pour votre compréhension et votre collaboration

L'ensemble du corps professoral qui a participé à ma formation et au personnel administratif et technique de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD.

Toute ma famille pour la confiance, les encouragements et le soutien sans faille.

Mention spéciale à ma mère.

Tous mes amis avec qui j'ai partagé le campus social de l'UCAD.

Tous mes camarades de classe avec qui j'ai partagé des années pleines de bonheur et de sensation. J'adresse une pensée pieuse à l'endroit de notre regretté camarade Dessamba DIENG rappelé brutalement à DIEU.

Tous mes promotionnaires de la Faculté des Sciences et Techniques.

# INTRODUCTION

# PREMIERE PARTIE

## DEUXIEME PARTIE

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

# **ANNEXES**

## **DEDICACES**



# **REMERCIEMENTS**

**LISTE DES ABREVIATIONS,  
DES TABLEAUX  
ET LISTE DES FIGURES**

# **SOMMAIRE**

**Titre :** COMPARAISON DE DEUX TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES INFECTIONS A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ET *NEISSERIA GONORRHOEAE* : COBAS AMPLICOR DES LABORATOIRES ROCHE, PCR CLASSIQUE VERSUS M2000RT DES LABORATOIRES ABBOTT, PCR EN TEMPS REEL

**Prénom et nom du candidat :** Aliou GNINGUE

**Nature du Mémoire :** Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Animale

### **Composition du Jury**

<u>Président</u> :	Bhen Sikina	TOGUEBAYE, Professeur,	FST/ UCAD
<u>Membres</u> :	Mamadou Thiam	DIOP, Maître Assistant,	ENSA/ UTH
	Ngor	FAYE, Maître de Conférences,	FST/ UCAD
	Ndèye Coumba Touré KANE,	Maître de Conférences Agrégé,	ESP/ UCAD
	Mbacké	SEMBENE, Maître de Conférences,	FST/ UCAD

### **Résumé**

A l'échelle mondiale, *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* sont les causes majeures des infections sexuellement transmissibles (IST). Ces IST favorisent la transmission du VIH. Elles peuvent être asymptomatiques, évoluer vers la chronicité ou présenter des complications très graves. Un diagnostic précoce, efficace et rapide est nécessaire pour initier le plus tôt possible le traitement approprié. De nos jours, le diagnostic de *C. trachomatis* (CT) et *N. gonorrhoeae* (NG) est essentiellement basé sur les techniques moléculaires qui sont meilleures que les techniques classiques. Cependant, il existe différentes techniques moléculaires et celles-ci peuvent affecter, aussi bien les travaux des laboratoires que les coûts des tests, d'où la nécessité de les comparer entre pour une utilisation judicieuse. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'évaluer les performances de diagnostic du système m2000 Abbott en comparaison avec celles du Cobas Amplicor des laboratoires Roche. Pour ce faire, nous avons utilisé ces deux techniques dans l'étude de prélèvements d'urines et par écouvillonnage endocervical de 168 sujets sénégalais provenant de différents types de populations (population générale, travailleuses du sexe et hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes). Les résultats que nous avons obtenus montrent que le m2000 est aussi performant que le Cobas Amplicor. Néanmoins, de réalisation plus facile, le m2000 présente peu d'étapes manuelles, un temps d'exécution et un taux d'inhibition moindres. Malheureusement, il coûte plus cher que le Cobas Amplicor. Quant à ce dernier, il est souvent inhibé avec les prélèvements par écouvillonnage endocervical, ce qui lui fait perdre son avantage économique sur le test m2000. Le m2000 est donc très adéquat pour le diagnostic de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*, et particulièrement plus efficace pour les laboratoires de diagnostic de routine. En définitive, tous ces résultats suggèrent : d'une part, l'utilisation du test m2000, aussi bien pour les prélèvements d'urines que pour ceux par écouvillonnage endocervical ; d'autre part, l'utilisation du Cobas Amplicor, de préférence, pour les prélèvements d'urines. Cependant, puisqu'il existe plusieurs types de prélèvements, il serait important de chercher le (s) prélèvement (s) le (s) plus appropriés dans le diagnostic de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* pour chacune de ces techniques. En outre la cause de l'inhibition des tests dans l'étude des prélèvements par écouvillonnage endocervical doit aussi être recherchée.

**Mots clés :** Diagnostic, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Cobas Amplicor, m2000rt.

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	:	Acide Désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	:	Acide Ribonucléique
<b>ATP</b>	:	Adénosine Triphosphate
<b>Avidine-HRP</b>	:	Avidine Peroxydase de Raifort
<b>CD</b>	:	Cycle Delta
<b>CE</b>	:	Corps Elémentaires
<b>CMI</b>	:	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CO</b>	:	Cycle de décision seuil
<b>CR</b>	:	Corps Réticulés
<b>CT</b>	:	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>CT/NG</b>	:	<i>Chlamydia trachomatis</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>dNTPs</b>	:	dinucléotides Triphosphates
<b>DO</b>	:	Densité Optique
<b>dUTP</b>	:	désoxyuridine triphosphate
<b>ELISA</b>	:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>ENSC</b>	:	Enquête Nationale de Surveillance Combinée
<b>FN</b>	:	Faux Négatifs
<b>FP</b>	:	Faux Positifs
<b>Ho</b>	:	Hypothèse nulle
<b>H1</b>	:	Hypothèse alternative
<b>IC</b>	:	Internal Control
<b>Ig</b>	:	Immunoglobuline
<b>IM</b>	:	Intra Musculaire
<b>IST</b>	:	Infections Sexuellement Transmissibles
<b>IV</b>	:	Intra Veineuse
<b>K</b>	:	Coefficient Kappa
<b>LCR</b>	:	Ligase Chain Reaction
<b>LGV</b>	:	Lymphogranulomatose Vénérienne
<b>LPS</b>	:	Lipopolysaccharide
<b>m2000rt</b>	:	m2000 real time
<b>m2000sp</b>	:	m2000 sample preparation

<b>MIF</b>	:	Micro Immuno Fluorescence
<b>MOMP</b>	:	Major Outer Membrane Protein
<b>MSM</b>	:	Men Having Sex with Men
<b>NC</b>	:	Nombre de Cycles
<b>NG</b>	:	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONUSIDA</b>	:	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
<b>PCA</b>	:	Probe Competition Assay
<b>PCR</b>	:	Polymerase Chain Reaction
<b>Pe</b>	:	Proportion d'accord aléatoire
<b>PG</b>	:	Population Générale
<b>PMN</b>	:	Polymorphonuclear
<b>Po</b>	:	Proportion d'accord observée:
<b>Se</b>	:	Sensibilité
<b>Sem</b>	:	Sensibilité moyenne
<b>SIDA</b>	:	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
<b>Sp</b>	:	Spécificité
<b>Spm</b>	:	Spécificité moyenne
<b>TMA</b>	:	Transcription Mediated Amplification
<b>TMB</b>	:	Tétraméthylbenzidine
<b>TNF</b>	:	Tumor Necrosis Factor
<b>TS</b>	:	Travailleuse du sexe
<b>UNG</b>	:	Uracile-Nglycosylase
<b>VIH</b>	:	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>VN</b>	:	Vrais Négatifs
<b>VP</b>	:	Vrais Positifs
<b>VPN</b>	:	Valeur Prédictive Négative
<b>VPNm</b>	:	Valeur Prédictive Négative moyenne
<b>VPP</b>	:	Valeur Prédictive Positive
<b>VPPm</b>	:	Valeur Prédictive Positive moyenne

(1), (2),...renvoient aux sites Internet consultés (annexe 2)

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composants de la membrane externe de <i>N. gonorrhoeae</i> qui pourraient jouer un rôle dans la virulence.....	19
Tableau 2 : Interprétation des résultats pour <i>C. trachomatis</i> avec le Cobas Amplicor.....	39
Tableau 3 : Interprétation des résultats pour <i>N. gonorrhoeae</i> avec le Cobas Amplicor.....	39
Tableau 4 : Résultats des tests quelconques.....	44
Tableau 5 : Proportions jointes des jugements de deux juges sur une échelle de r catégories.....	45
Tableau 6 : Effectifs joints des jugements de deux juges sur une échelle de r catégories.....	45
Tableau 7 : Degré d'accord et la valeur kappa.....	46
Tableau 8 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements par écouvillonnage endocervical.....	47
Tableau 9 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements d'urines.....	48
Tableau 10 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 par population cible et type de prélèvement.....	49
Tableau 11 : Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection de <i>C. trachomatis</i> et de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	52
Tableau 12 : Evaluation comparée des deux techniques.....	52
Tableau 13 : Suite de l'évaluation comparée des deux techniques.....	53
Tableau 14 : Tableau de contingence de <i>C. trachomatis</i> pour les échantillons d'urines des MSM.....	53
Tableau 15 : Calcul des valeurs de la sensibilité de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative.....	53
Tableau 16 : Tableau de contingence de <i>N. gonorrhoeae</i> sur les échantillons d'urines des MSM.....	54
Tableau 17 : Calcul des valeurs de la sensibilité de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative.....	55
Tableau 18 : Tableau de contingence de <i>C. trachomatis</i> sur les écouvillons des TS.....	56
Tableau 19 : Tableau de contingence de <i>N. gonorrhoeae</i> sur les écouvillons des TS .....	56
Tableau 20 : Résumé des valeurs moyennes de la sensibilité de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative.....	57

## Liste des figures

Figure 1 : Morphologie de <i>C. trachomatis</i> .....	7
Figure 2 : Cycle de développement de <i>C. trachomatis</i> .....	7
Figure 3 : <i>C. trachomatis</i> sous forme latente.....	8
Figure 4 : Morphologie de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	16
Figure 5 : <i>N. gonorrhoeae</i> dans une cellule polynucléaire.....	16
Figure 6 : Pathologie non compliquée et cycle de développement de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	17
Figure 7 : Souches de <i>N. gonorrhoeae</i> dans une culture pure.....	18
Figure 8 : Souche de <i>N. gonorrhoeae</i> dans du pus de la gonorrhée.....	18
Figure 9 : Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR.....	28
Figure 10 : Graphique de l'amplification par PCR en temps réel.....	29
Figure 11 : Détection par fluorescence en temps réel.....	29
Figure 12 : Chargement des couronnes d'échantillons.....	38
Figure 13 : Couronne chargée dans le module d'amplification.....	38
Figure 14 : Identification par code barre des cassettes.....	38
Figure 15 : Pipetage de réactif.....	38
Figure 16 : Transfert des portoirs et des plaques dans le système m200sp.....	41
Figure 17 : Transfert de la plaque de réaction optique à 96 puits au système m2000rt.....	42
Figure 18 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements par écouvillonnage endocervical.....	48
Figure 19 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements d'urines.....	48
Figure 20 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements d'urines de la population générale.....	50
Figure 21 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements par écouvillonnage endocervical de la population générale.....	50
Figure 22 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements par écouvillonnage endocervical des travailleuses du sexe.....	51
Figure 23 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements d'urines des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes.....	51
Figure 24 : Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection de <i>C. trachomatis</i> et de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	52





Les infections sexuellement transmissibles (IST) constituent un véritable problème de santé publique. Elles font partie des cinq pathologies les plus fréquentes dans les pays en voies de développement. Elles constituent un groupe d'affections qui, à travers leur recrudescence actuelle et leurs impacts sociaux, sanitaires et économiques méritent une certaine réflexion (1). Selon l'OMS, plus de 300 millions de cas d'IST surviennent chaque année à travers le monde. Plus de 85 millions de ces cas sont dus à *Chlamydia trachomatis* et plus de 55 millions à *Neisseria gonorrhoeae* (2). Malheureusement près de 80% des femmes et 10% des hommes infectés sont asymptomatiques mais peuvent, comme les symptomatiques, transmettre l'infection.

Les IST favorisent grandement la transmission du VIH (Hayes *et al*, 1995). Le risque d'être infecté est multiplié par un chiffre compris entre 2 et 10 lors d'un rapport sexuel non protégé (3).

A ce jour, il n'existe pas de vaccin effectif contre ces infections. Par conséquent, le contrôle de ces infections dépend de la surveillance des populations à risque, la prise de mesures de santé publique pour limiter la propagation de ces infections et des interventions précoces pour traiter les individus infectés.

La disponibilité de méthodes de diagnostic d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité constitue l'une des plus grandes mesures préventives contre ces infections (Hans *et al*, 2005). En revanche, la méconnaissance d'un diagnostic et l'absence de traitements des IST peuvent conduire à de sérieuses complications et séquelles graves parmi lesquelles l'infécondité, la perte de fœtus, la grossesse extra-utérine, les décès prématurés, les cancers ano-génitaux, l'infection du nouveau né, etc.

Pour mieux prévenir les IST et améliorer les capacités de prise en charge, il est nécessaire de développer des stratégies de diagnostic efficaces, rapides et de réalisation facile qui couvriront à la fois la contrainte de grand nombre et le besoin de fiabilité des résultats. Cette nécessité de techniques de diagnostic de routine, fiables et facile à réaliser limite l'efficacité de plusieurs techniques dans le cadre du diagnostic de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae*.

En effet, les techniques de diagnostic indirect sont basées sur la réponse immune du patient alors que celle-ci est souvent faible au début de l'infection. L'infection à *N. gonorrhoeae* semble ne pas induire d'immunité. L'infection à *C. trachomatis* induit la production d'anticorps IgM, IgG, IgA et IgE mais ceux-ci ne préviennent pas la réinfection. Il

s'ajoute à cela l'existence de cicatrices sérologiques dues à *C. trachomatis*, de réactions croisées entre les différentes espèces de *Chlamydia* et des difficultés d'interprétation des résultats.

Les techniques directes comme l'observation en microscopie photonique et la culture requièrent une certaine technicité et du temps. Elles peuvent apparaître négatives en raison d'un traitement incomplet ou incorrect. Les cultures sont en outre délicates, fastidieuses et peuvent être limitées par l'inadéquation de certains échantillons qui viennent, en particulier, des hommes. En effet, il y a un petit nombre de cellules qui peuvent être collectées par écouvillonnage urétral (Quin *et al*, 1996).

Les techniques moléculaires manuelles requièrent également du temps et peuvent livrer des résultats faussement positifs ou faussement négatifs (Puuolakkainen *et al*, 1998). Il existe en effet un important potentiel de risque de contamination croisée ou de dégradation du produit amplifié lors des manipulations après la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR.

Les techniques moléculaires automatiques s'affranchissent de toutes ces contraintes. Plusieurs études ont montré qu'elles sont les meilleures dans le diagnostic surtout précoce des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* (Black et Morse 2000 ; Semeniuk *et al*, 2002 ; Lenderman *et al*, 2007). Les plus utilisées sont basées sur la PCR qui a l'avantage d'avoir une grande sensibilité, une grande spécificité ainsi qu'une bonne faisabilité et reproductibilité des résultats (Serre *et al*, 2002).

Dans les cas du diagnostic des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* et dans les enquêtes à grande échelle, l'évolution des outils de la biologie moléculaire a apporté des progrès sans précédents (Delaveyne *et al*, 2003). Il est désormais possible de diagnostiquer ces infections à partir des seules urines des patients, rendant ainsi les prélèvements moins contraignants par rapport aux méthodes classiques. La mise en évidence des bactéries peut se faire en quelques heures seulement par la détection de l'ADN.

Cependant, depuis leur mise en œuvre, ces techniques moléculaires ont beaucoup évolué jusqu'à l'avènement des techniques de PCR en temps réel. Le nouveau système m2000 Abbott de diagnostic des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* basé sur la PCR en temps réel a été récemment introduit dans les laboratoires. Il trouve sur place d'autres techniques dont la première technique automatisée de diagnostic de ces infections basée sur la PCR classique comme le Cobas Amplicor des laboratoires Roche. Il s'avère ainsi indispensable de comparer ces deux techniques en termes de performances et de coût, surtout

pour optimiser leur introduction dans les laboratoires des pays à ressources limitées. En outre, un gain économique est à prévoir en contre partie de l'investissement initial et d'une certaine réorganisation du travail.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposé dans ce travail :

- D'évaluer les performances de diagnostic des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* de l'automate m2000 Abbott real time sur des prélèvements d'urines et des prélèvements par écouvillonnage endocervical recueillis sur trois types de populations :
  - ✓ La population générale.
  - ✓ Une population de travailleuses du sexe.
  - ✓ Une population d'hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes.
- De comparer ces performances à celles de l'automate Cobas Amplicor des laboratoires Roche.

Notre mémoire de DEA de Biologie Animale qui présente ce travail s'articule sur deux grandes parties :

- La première partie est consacrée aux généralités sur les infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*.
- La deuxième partie présente le matériel et la méthodologie utilisés, ainsi que les résultats obtenus et leur discussion.

**Généralités sur les infections à *Chlamydia trachomatis* et  
*Neisseria gonorrhoeae***

## Chapitre I : Infections à *Chlamydia trachomatis*

### I. 1. Définition

Les chlamydia sont des bactéries Gram négative et non mobiles, et à développement intracellulaire obligatoire des cellules eucaryotes. Elles forment des inclusions dans le cytoplasme de la cellule hôte. Elles sont de petite taille et sont responsables d'I.S.T.

### I. 2. Historique

En 1906, Haelberstaeder et Von Prowzek découvraient des inclusions dans les frottis conjonctivaux de trachomateux. (Avril *et al*, 2000). En 1907, ils visualisèrent les chlamydia dans les cellules conjonctivales des trachomateux. L'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (L.G.V) fut isolé par Leviditi en 1931 par inoculation au singe et à la souris blanche, puis par Myagawa en 1935 par culture sur œufs embryonnés (Freney *et al*, 2000). Il a été constaté que le cycle de croissance de l'agent responsable de la lymphogranulomatose vénérienne est semblable à celui responsable de la pandémie de psittacose observée en 1929-1930 et isolé par Bedson sur œuf embryonné.

. Ces agents du trachome de la L.G.V et de la psittacose furent désignés tour à tour sous le nom de Bedsonia, Myagawanella, Neorickettsie et le lien entre eux fut établi en 1941.

En 1959 Jones *et al.* réussissent à isoler par culture une souche de *Chlamydia* à partir d'un prélèvement du col utérin d'une mère dont l'enfant présentait une conjonctivite néonatale.

En 1964 *C. trachomatis* était isolé d'urèthres masculins et Moulder montrait que ces micro-organismes sont des bactéries à développement intracellulaires (Avril *et al*, 2000).

Les Chlamydiaceae ont été séparées des Rickettsies en 1970.

### I. 3. Classification

Règne :	Végétal.
Sous-règne :	Bactéries.
Embranchement :	Chlamydiae.
Ordre :	Chlamydiales.
Famille :	Chlamydiaceae.
Genre :	<i>Chlamydia</i> .
Espèce :	<i>Chlamydia trachomatis</i> (4).

L'espèce *C. trachomatis* est strictement parasite de l'homme et est subdivisée en quinze immunotypes ou sérotypes répartis en trois groupes responsables d'un type particulier

de pathologie. Les sérotypes A, B, Ba, et C sont associés au trachome alors que les sérotypes D, E, F, G, H, I, J et K sont responsables des infections sexuellement transmissibles, des infections oculaires et néonatales. Les sérotypes L1, L2 et L3 sont responsables de la Lymphogranulomatose vénérienne.

#### **I. 4. Caractères bactériologiques**

##### **I. 4. 1. Morphologie, génome et cycle de développement**

###### **I. 4. 2. 1. Morphologie et génome**

Les *Chlamydia* sont des bactéries de petite taille, de forme coccoïde, de 0,30 à 1 micromètre de diamètre. (Figure 1). Elles possèdent les deux types d'acides nucléiques ADN et ARN. Leur génome consiste en un chromosome circulaire et un plasmide cryptique (d'une taille de 7500pb) conservé est présent en plusieurs copies (5 à 10 copies par corps élémentaire) dans la bactérie.

###### **I. 4. 2. 2. Cycle de développement (Figure 2)**

*C. trachomatis* est une bactérie qui utilise l'ATP de la cellule hôte par défaut de synthèse propre et montre un cycle de multiplication intracellulaire particulier qui se déroule en deux phases pendant lesquelles la bactérie se présente sous deux formes :

- Les corps élémentaires (C.E) : ce sont les particules infectieuses qui n'ont aucune activité métabolique. Ils s'attachent à la cellule hôte, sécrètent du sulfate d'héparine qui va se lier aux récepteurs cellulaires et bactériens et entrent dans celle-ci par invagination de la membrane. Ils sont ainsi ingérés par la cellule et protégés par un phagosome. Ils sont de petite taille, coccoïdes, de 300nm de diamètre et présentent un appareil nucléaire condensé en périphérie du cytoplasme. Leur paroi, dépourvue de peptidoglycane, possède dans sa membrane un lipopolysaccharide (L.P.S) et des protéines assurant par des ponts SS une cohésion forte.
- Les corps réticulés (C.R) : de taille plus importante (1µm de diamètre), ils sont formés par germination des C.E dans le phagosome de la cellule infectée. Ils persistent car la bactérie s'oppose à l'union phagosome-lysosome. Ce sont les formes métaboliquement actives, intracellulaires, qui se multiplient par division binaire. Leur membrane est beaucoup plus fluide que celle des CE. Par condensation et en passant par des corps intermédiaires, ils redonnent des corps élémentaires qui sont excrétés par exocytose de la cellule 48 à 72 heures après l'étape initiale. L'espèce peut exister sous

une forme latente dans les cellules. La culture est alors négative. Une résurgence de l'infection et une chronicité sont donc possibles (figure 3) (5).



Figure 1 : Morphologie de *C. trachomatis* (6).

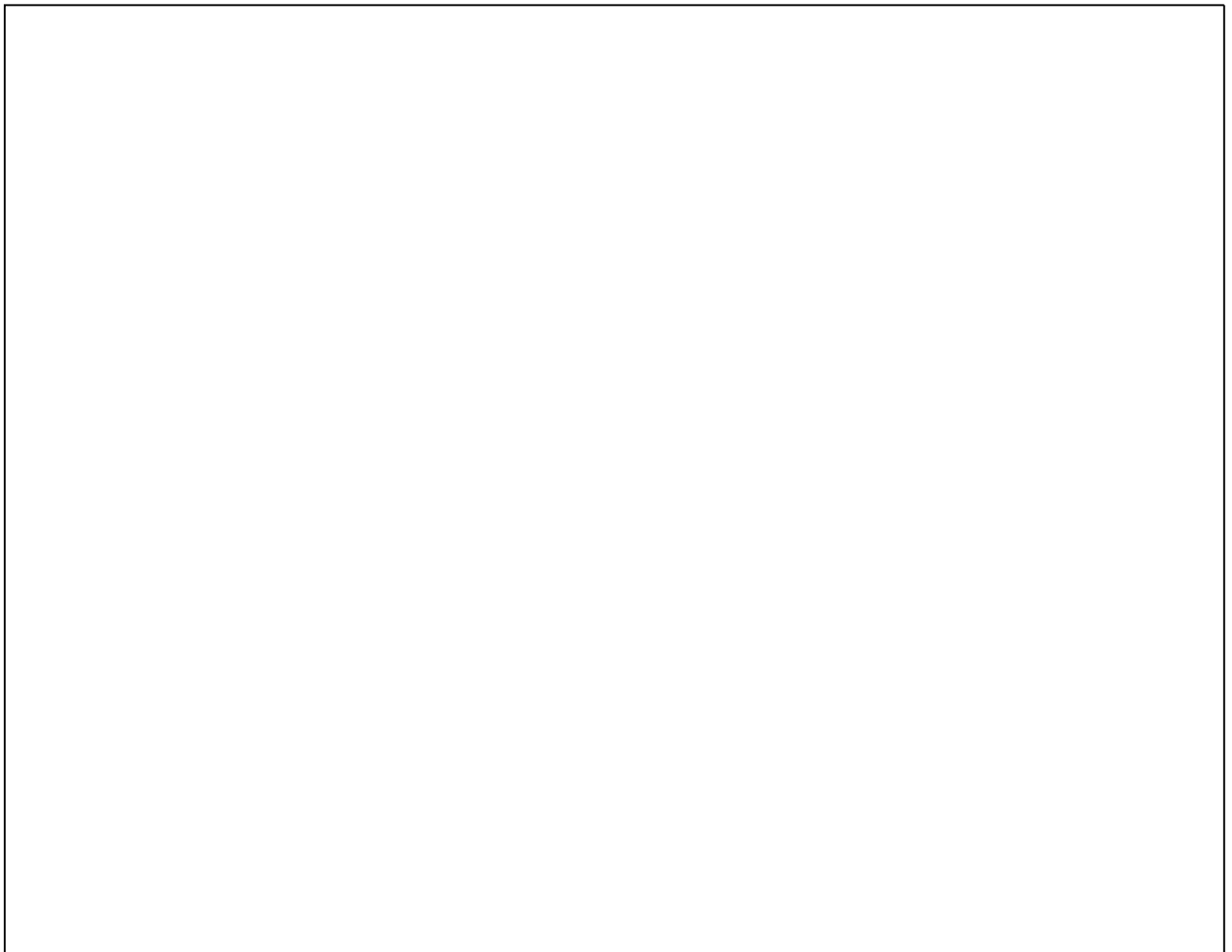


Figure 2 : Cycle de développement de *C. trachomatis* (7).



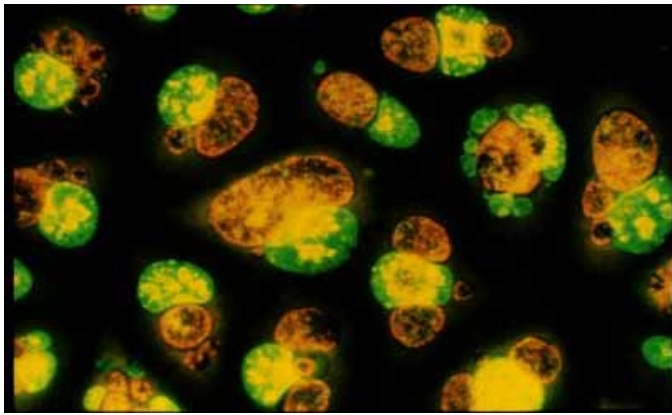


Figure 3 : *C. trachomatis* sous forme latente (5).

#### **I. 4. 2. Caractères cultureux**

Les chlamydia sont incapables de croître sur milieu synthétique. Ils se développent dans la membrane vitelline de l'œuf embryonné et sur culture cellulaire.

##### **I. 4. 2. 1. Culture sur œuf embryonné**

Pendant longtemps, l'inoculation à l'œuf de poule embryonné par voie intravitelline a constitué le seul moyen d'isoler les chlamydia. 0.1 à 0.5 ml du produit pathologique est broyé dans la cavité vitelline d'œufs de poule ou de canne de 6 à 7 jours.

Les œufs sont inoculés à 35°C en atmosphère humide pour *Chlamydia trachomatis*. La mort de l'embryon survient dans un délai qui est fonction de la quantité de chlamydia inoculée. Malgré sa sensibilité, cette culture n'est pas toujours satisfaisante à cause des contaminations bactériennes qui tuent l'embryon très rapidement.

##### **I. 4. 2. 2. Culture sur lignée cellulaire**

*Chlamydia trachomatis* se multiplie seulement dans les cellules épithéliales, deux lignées cellulaires sont principalement recommandées pour leur sensibilité :

- Les cellules de Mac COY issues d'une synoviale humaine mais ayant perdu toute trace de leur origine humaine.
- Les cellules Héla 209 issues d'un carcinome du col utérin.

La culture des cellules est réalisée en milieu RPMI 1640, supplémenté en sérum de veau foetal, glutamine, en cycloheximide et gentamicine.

Quelle que soit la lignée cellulaire choisie, il faut respecter trois conditions : l'inhibition de la multiplication cellulaire, la centrifugation de l'inoculum et l'enrichissement du milieu de culture.

#### **I. 4. 3. Structure antigénique**

La structure antigénique des chlamydia est complexe et les antigènes ont des spécificités de genre ou groupe, d'espèce et de type.

##### **I. 4. 3. 1. Antigènes de genre**

Il existe un LPS présent dans la paroi externe, thermostable et commun aux trois espèces. Cet antigène présent à tous les stades du cycle de développement est capable de fixer le complément. Il s'agit d'un LPS de 10 kda qui renferme le trisaccharide alpha-acide-3-désoxy-D-manno-octulosomique. (Ndiaye, 1994 et Batteiger, 1996).

##### **I. 4. 3. 2. Antigènes d'espèces.**

Ce sont des protéines thermolabiles et associées à la membrane cytoplasmique. Elles sont présentes à tous les stades du cycle de développement. La plus importante est la protéine majeure de membrane externe ou Major Outer Membrane Protéine (M.O.M.P) qui jouerait un rôle de porine. Immunogène puissant, cette protéine est utilisée pour la fabrication d'anticorps monoclonaux et constitue un candidat potentiel pour la mise au point d'un vaccin. Cet antigène est surtout présent sur la membrane externe des C.E de *C. trachomatis*. Il ne diffuse pas à l'extérieur des cellules contrairement à l'antigène L.P.S.

##### **I. 4. 3. 3. Antigènes spécifiques de types**

Protéines thermolabiles, ils permettent la classification de tous les sérotypes de *C. trachomatis*. Il existe 15 sérotypes ou immunotypes de *C. trachomatis* (Cabral *et al*, 2003), répartis en trois groupes (Geisler *et al*, 2003).

- Groupe 1 : les sérotypes A, B, Ba et C.
- Groupe 2 : les sérotypes D, E, F, G, H, I, J, K.
- Groupe 3 : les sérotypes L1, L2 et L3.

#### **I. 4. 4. Réponse immune à *Chlamydia trachomatis***

La possibilité d'infections multiples et répétées chez la même personne montre que l'immunité naturelle est faible. Des essais de vaccination contre le trachome avec des cellules entières de *C. trachomatis* ont montré une efficacité réduite et de courte durée.

## **I. 5. Localisation et épidémiologie**

### **I. 5. 1. Localisation**

*C. trachomatis* a pour hôte exclusif l'homme. Son site particulier est constitué par les cellules épithéliales des muqueuses conjonctivales, urétrales et vaginales mais il peut gagner les voies génitales hautes en l'absence de traitement.

### **I. 5. 2. Epidémiologie**

Responsables du trachome, les sérotypes A, B, Ba et C, sont transmis le plus souvent indirectement par les mains et les objets souillés et les mouches.

Les souches appartenant aux sérovars D à K sont transmises par les relations sexuelles. Les infections oculaires de l'adulte dues à ces souches sont souvent associées à une infection génitale. Le nouveau-né s'infecte au moment de l'accouchement (Avril *et al*, 2000).

Les infections à *C. trachomatis* sont presque retrouvées dans toutes les couches de la société mais les plus touchées sont les jeunes et les pauvres (Scatcher et Stamm, 1999).

*Chlamydia trachomatis* est la première cause d'I.S.T bactériennes avec 85 millions de nouveaux cas par an. C'est probablement l'agent pathologique le plus répandu dans le monde (Sturm-ramirez *et al*, 2000). Les régions les plus touchées au monde sont l'Afrique subsaharienne et l'Asie du Sud et du Sud-est. Au Sénégal la prévalence des infections à *Chlamydia trachomatis* est de 4% chez les travailleuses du sexe, 4,1% chez les hommes ayant de rapports sexuels avec d'autres hommes et 0,6% chez les partenaires sexuels masculins des prostituées (Mboup *et al*, 2006). L'infection par cette espèce multiplie par 1 à 3 le facteur de risque d'être infecté par le VIH chez les groupes à haut risque (Lalou *et al*, 2007).

## **I. 6. Pouvoir pathogène**

*C. trachomatis* est responsable de la chlamydie, du trachome et du lymphogranulome vénérien.

Chez l'homme, la bactérie est la cause d'écoulements urétraux (urétrites), d'épididymites, d'orchites et de stérilité. Chez la femme il y a plusieurs infections et conséquences telles que cervicites, endométrites, salpingites, infections génitales hautes, stérilité, ruptures prématurées des membranes et périhépatite. Dans les deux sexes, *C. trachomatis* est la cause de rectites, de pharyngites et du syndrome de Reiter. Chez le nouveau-né la bactérie est responsable de conjonctivites et de pneumonies.

Les souches L1 à L3 sont responsables de la lymphogranulomatose vénérienne. Dans les deux sexes il y a des ulcères, des oedèmes inguinaux et des rectites.

## **I. 7. Manifestations cliniques**

*C. trachomatis* est souvent appelé « l'agent de l'infection silencieuse » parce qu'environ 75% des femmes et 50% des hommes infectés sont asymptomatiques. Les symptômes apparaissent souvent une à trois semaines après une exposition contaminante.

### **I. 7. 1. Trachome**

C'est une kérato-conjonctivite contagieuse caractérisée par la formation de follicules. Après 7 à 21 jours d'incubation, apparaît une conjonctivite marquée par une inflammation importante accompagnée de sécrétions purulentes. Elle peut évoluer vers la cécité par surinfection bactérienne, complications mécaniques et ulcérations cornéennes.

### **I. 7. 2. Infections uro-génitales**

#### **I. 7. 2. 1. Chez l'homme**

Dans l'urétrite à *C. trachomatis*, l'incubation est de quelques jours à quelque mois. En moyenne, elle est de 10 à 15 jours. Il y a inflammation de l'urétrite mais dans la majorité des cas l'infection est asymptomatique. Le plus souvent il y a un écoulement transparent (Morsure *et al*, 2000). L'urétrite aigue se manifeste par un écoulement purulent abondant accompagné de vives brûlures mictionnelles et quelquefois d'hémorragie. Les complications sont possibles comme l'épididymite, surtout chez l'homme de moins de 35 ans, la prostatite, la stérilité (Scatcher, 1999 et Westrom, 1996). La rectite se manifeste par une douleur rectale modérée, un ténesme, un écoulement muqueux et éventuellement un saignement.

#### **I. 7. 2. 2. Chez la femme**

L'infection aboutit souvent à une cervicite mucopurulente associant une exo cervicite avec un col érythémateux et friable. Les autres signes sont une endo-cervicite avec un écoulement jaunâtre mucopurulente par le col utérin, des oedèmes de la zone d'ectopie cervicale et une propension de la muqueuse à saigner au moindre traumatisme (Stamm et Holmes 1972).

La salpingite est une complication majeure. Elle se manifeste par une inflammation pelvienne. Les signes et les symptômes majeurs incluent la fièvre, les douleurs abdominales basses, la stérilité utérine.

### **I. 7. 2. 3. Complications générales**

Il y a le syndrome de Reiter qui est une arthrite dont les symptômes apparaissent 1 à 4 semaines après le début de l'urétrite. L'infection haute peut se compliquer d'une périhépatite ou syndrome de Fitz-hugh-curtis. L'infection haute s'accompagne de complications tubaires, cause de stérilité et de grossesses extra-utérines.

### **I. 7. 2. 4. Infections néonatales.**

Les nouveaux-nés des mères infectées sont contaminés pendant l'accouchement. Après une incubation d'une à 2 semaines, 20 à 25% des enfants contaminés développent une conjonctivite mucopurulente parfois associée à une rhinite ou une atteinte de l'oreille moyenne. La pneumonie peut apparaître chez les enfants contaminés au bout de 4 à 12 semaines de vie. Elle se manifeste généralement par une toux coqueluchoïde.

### **I. 7. 3. Lymphogranulomatose vénérienne ou LGV**

Elle se caractérise, après 3 à 30 jours d'incubation, par un micro-chancres qui apparaît au point d'inoculation (gland, vagin, anus). Quelques jours plus tard, il y a une polyadénopathie inguinale qui va donner lieu à de multiples fistules. Des localisations extra-génitales peuvent survenir (neurologiques, articulaires, oculaires etc.). Après plusieurs années, les complications se manifestent par des éléphantiasis génitaux ou un rétrécissement et des fistules du pénis, de l'urètre ou du rectum.

## **I. 8. Diagnostic biologique**

### **I. 8. 1. Prélèvement**

La qualité du prélèvement conditionne la pertinence des résultats. En effet, le prélèvement doit obligatoirement comporter des cellules en raison de la localisation intracellulaire des bactéries.

- Chez l'homme : on effectue un prélèvement urétral par écouvillonnage profond.
- Chez la femme : on effectue un prélèvement endocervical par écouvillonnage après pose d'un spéculum vaginal.
- Chez le nouveau-né : on recueille les cellules épithéliales en frottant un écouvillon sur la conjonctive enflammée. En cas de pneumonie, l'aspiration naso-pharyngée ou trachéo-bronchique est le prélèvement de choix.
- Pour le diagnostic sérologique : il faut faire un prélèvement sanguin.

Dans tous les cas, il faut ensemencer immédiatement le milieu de culture ou utiliser un milieu de transport. Par exemple le milieu de saccharose phosphate contenant un sérum et des antibiotiques ou milieu 2SP. La conservation se fait à 4°C, si les prélèvements doivent être traités immédiatement et à – 80°C pour une longue durée.

### **I. 8. 2. Examen direct**

Au microscope photonique, l'examen de frottis colorés au Giemsa ou au lugol permet de mettre en évidence dans les cellules, les inclusions cytoplasmiques contenant des granulations punctiformes caractéristiques des *Chlamydia*.

L'examen du frottis peut se faire également en immunofluorescence en présence d'anticorps antichlamydiens monoclonaux marqués. Au microscope à fluorescence, les chlamydia apparaissent sous forme de corps élémentaires extracellulaires punctiformes émettant une fluorescence vert pomme tranchant sur fond orangé de la préparation. C'est une technique simple, rapide mais exigeant un certain entraînement pour la lecture. Elle est aussi difficilement utilisable pour de grandes séries de prélèvements.

Les méthodes immunoenzymatiques sont très utilisées et mettent en évidence l'antigène bactérien. Elles sont rapides et objectives mais manquent parfois de sensibilité.

### **I. 8. 3. Culture**

C'est la méthode de référence. La culture est réalisée dans les cellules de Mac Coy ou Hela 229. Les prélèvements doivent être centrifugés à 3000g et à 35°C pendant une heure. Les cultures sont ensuite additionnées de cycloheximide ou de cytocholasine B qui vont inhiber la multiplication des cellules sans entraver celle des chlamydia. L'incubation se fait en atmosphère de CO<sub>2</sub> pendant 48 à 72 heures. Les cultures sont ensuite examinées en immunofluorescence.

### **I. 8. 4. Sensibilité aux antibiotiques**

L'ordre d'activité décroissante in vitro des antibiotiques supposés actifs est la suivante : la rifampicine, les tétracyclines, les sulfamides, les macrolides et les fluoroquinolones qui ont une forte pénétration intracellulaire (De Barbeyrac *et al*, 1997).

### **I. 8. 5. Recherche d'anticorps sériques**

Les réactions de micro-immunofluorescence (M.I.F) ou les méthodes ELISA sont utilisées. La M.I.F mesure les anticorps par spécificité de sérovar et par classe d'immunoglobuline (IgG, IgA ou les IgM). Toutefois, la sérologie pose des problèmes

d'interprétation. En effet, un taux d'anticorps supérieur à 64 UI chez la femme et supérieur à 32 UI chez l'homme peut correspondre soit à une chlamydiose débutante, soit à une cicatrice sérologique. Un taux élevé supérieur à 256 UI évoque une chlamydiose profonde.

## **I. 9. Traitement et prévention**

### **I. 9. 1. Traitement**

*Chlamydia trachomatis* peut être traitée et guérie avec des antibiotiques qui ont une forte pénétration intracellulaire. Les cyclines, les macrolides, la rifampicine et les nouvelles quinolones répondent à ce critère de choix et ont des concentrations maximales inhibitrices (CMI) basses in vitro sur les souches de *C. trachomatis*.

### **I. 9. 2. Prévention**

En l'absence de vaccin les efforts de prévention doivent être basés sur une approche multidirectionnelle, c'est-à-dire :

- La sensibilisation et l'éducation sanitaire de la population.
- La recherche et le traitement des partenaires sexuels
- Le dépistage des populations à risque et de toute personne suspecte.
- La protection mécanique correcte des rapports sexuels jusqu'à la fin du traitement.
- Le contrôle de la guérison en fin de traitement.

## **Chapitre II : Infection à *Neisseria gonorrhoeae***

### **II. 1. Définition**

*N. gonorrhoeae*, couramment appelé le gonocoque, est une bactérie parasite exclusif de l'homme. Les souches possèdent des pili et certains antigènes protéiques de surface. L'espèce est responsable de la gonococcie qui est une maladie sexuellement transmissible (Pilet, 1979).

### **II. 2. Historique**

Le mot gonorrhée est d'origine grecque. Il est de Galien et signifie « écoulement de semences » (Hsieh *et al*, 2000).

Le mot blennorragie apparut dans les écrits de Swediaur en 1874.

Il s'agit d'une maladie infectieuse entraînant en général un écoulement génital purulent pouvant atteindre la région ano-rectale et le pharynx.

Longtemps Considérée comme une forme clinique de la syphilis, la gonococcie a été individualisée et séparée de la syphilis par Philippe Plicord en 1838.

Albert Neisser en 1879 a découvert très nettement le gonocoque dans le pus urétral et oculaire et a réussi la culture sur sang placentaire à 30-40°C.

En 1882 Leistikov et Loeffler réalisent la première culture sur sérum coagulé.

L'agent de la blennorragie est connu depuis l'antiquité puisque la première description a été faite en 2637 avant J.C. par l'empereur chinois Huang Ti.

### **II. 3. Classification.**

Règne :	VégétaL.
Sous-règne :	Bactéries.
Embranchement :	Protéobactéries.
Classe :	Bêta Protéobactéries.
Ordre :	Neisseriales.
Famille :	Neisseriaceae.
Genre :	<i>Neisseria</i> .
Espèce :	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> . (8)

### **II. 4. Caractères bactériologiques**

#### **II. 4. 1. Morphologie et génome**

Les gonocoques sont des diplocoques à Gram négatif dont chaque élément mesure de 0,6 à 0,8 micromètre de diamètre. Leur disposition en « grain de café » est caractéristique



(figure 4) (Barnes *et al*, 1984 cités Pomabia, 2007). Ils sont immobiles, non sporulés et aérobies stricts dans les produits pathologiques et en particulier le pus urétral. On les trouve souvent en amas plus ou moins important dans le cytoplasme des polynucléaires (figure 5). Leur génome est constitué d'ADN et d'ARN.

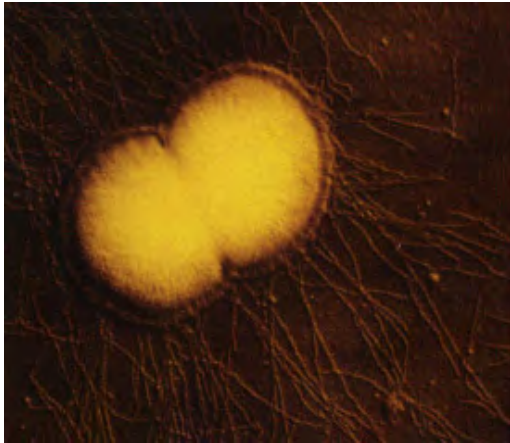


Figure 4 : Morphologie de *N. gonorrhoeae*.  
(9)



Figure 5 : *N. gonorrhoeae* dans une cellule polynucléaire (10)

#### II. 4. 2. Pathologie et cycle de développement (figure 6)

*N. gonorrhoeae* adhère uniquement aux microvillosités des cellules épithéliales non ciliées par l'intermédiaire des fimbriæ, des protéines Opa II et d'autres facteurs non spécifiques. Elle est entourée par les microvillosités qui la conduisent à la membrane basale. Libérée par exocytose, la bactérie pénètre dans les cellules muqueuses par un processus appelé parasitisme par endocytose. Durant l'endocytose la membrane des cellules muqueuses se rétracte et forme une vacuole contenant la bactérie. La bactérie se multiplie dans cette vacuole qui est transportée à la base des cellules où elle est libérée par exocytose dans les tissus subépithéliaux

Durant l'infection, les lipooligosaccharides et les peptidoglycanes sont libérés par autolyse des cellules. Ils vont de plus activer cette autolyse au moment où les lipopolysaccharides stimulent la production de facteurs de nécrose et de tumeurs qui causent des dommages cellulaires. Les lipopolysaccharides libèrent également des enzymes telles que des protéases et phospholipases qui seraient importants dans la pathogenèse. Les neutrophiles sont immédiatement attirés au site de l'infection pour donner une réplique à la bactérie. Mais pour des raisons inconnues, les gonocoques vont survivre dans les phagocytes jusqu'à ce que les neutrophiles meurent et libèrent les bactéries indigestes.

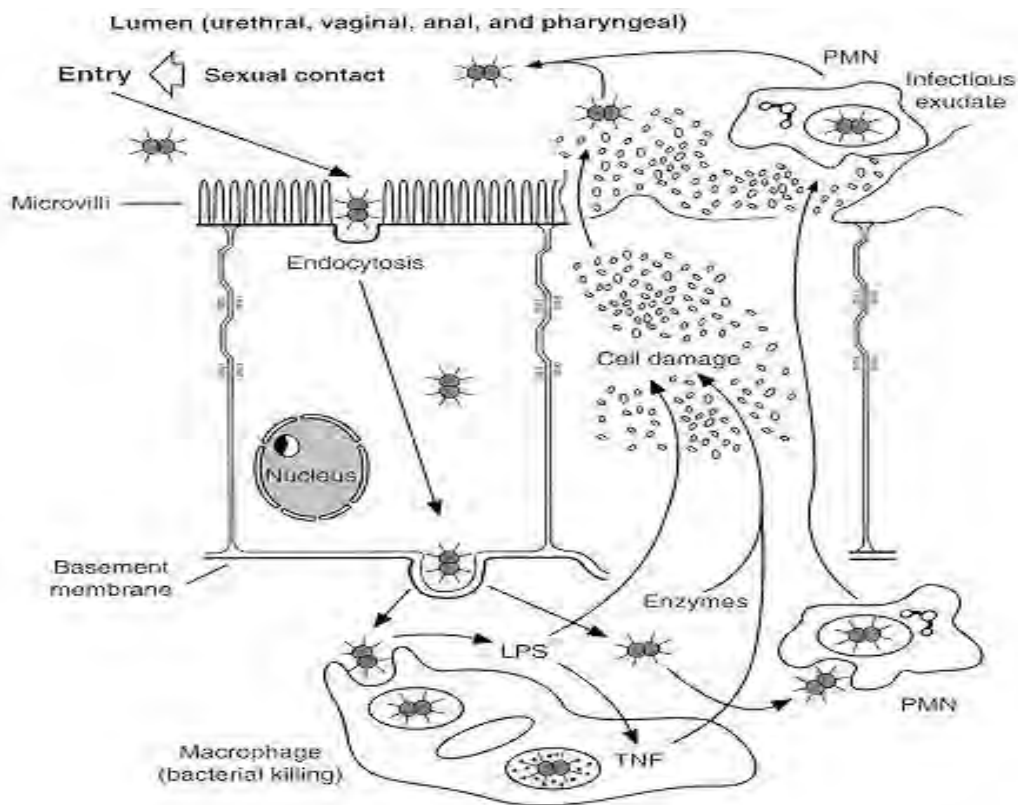


Figure 6 : Pathologie non compliquée et cycle de développement de *N. gonorrhoeae*.  
(11).

Légende :

Lumen (urethral, vaginal, anal and pharyngeal) = lumière uréthrale, vaginale, anale ou pharyngeal.

Sexuel contact  $\Rightarrow$  Entry = contact sexuel  $\Rightarrow$  entrée.

Microvilli = microvillosités.

Endocytosis = endocytose.

Nucleus = noyau.

Basement membrane = membrane basale.

Macrophage (Bacterial killing) = Macrophage (Bactéries tueuses).

LPS = lipopolyssacharides.

TNF (tumor necrosis factor) = facteur de tumeur et de nécrose.

Cell damage = cellules endommagées.

PMN (polymorphonuclear) = polynucléaires polymorphes.

Infectious exudate = exudats infectieux.

### II. 4. 3. Caractères cultureux

La culture est difficile en raison des multiples exigences métaboliques. Le CO<sub>2</sub> est nécessaire à la croissance du gonocoque (8 à 10 %). La température optimale de croissance est de 36 à 37°C. Le gonocoque est sensible aux acides gras contenus dans la gélose d'où la nécessité d'ajouter de l'hémine, du sang ou de l'amidon pour prévenir cette toxicité. Il est aussi sensible aux métaux lourds. L'exigence en cystéine est caractéristique de l'espèce. Certaines souches sont exigeantes en glutamine, thiamine, ou thiamine pyrophosphate. Ces composés devront être ajoutés au milieu après stérilisation. Le fer est également indispensable. La croissance de *N. gonorrhoeae* est inhibée par certaines espèces (streptocoque hémolytique du groupe B, levures) aussi ajoute-t-on les antibiotiques dans le milieu de culture sélectif (Milieu VCF ou VCN) :

- Vancomycine qui inhibe les bacilles à Gram positif et les cocci à Gram positif.
- Colistine qui inhibe les bacilles à Gram négatif.
- Fungizone ou Nystatine qui inhibe levures.
- Parfois du Cotrimoxazole qui inhibe le proteus (prélèvement anaux).

Ces produits inhibent 2 à 5 % des souches de gonocoques mais permettent son isolement dans les prélèvements pluri microbiens (prélèvements vaginaux).

*Neisseria gonorrhoeae* présente après 18 à 24 heures d'incubation des colonies grisâtres à bord régulier de 0.5 à 1µm de diamètre (figure 7). Ces colonies continuent de s'accroître pendant 1 à 2 j ours. Le micro-organisme est fréquemment trouvé dans les polynucléaires polymorphes (neutrophiles) du pus urétral (figure 8).

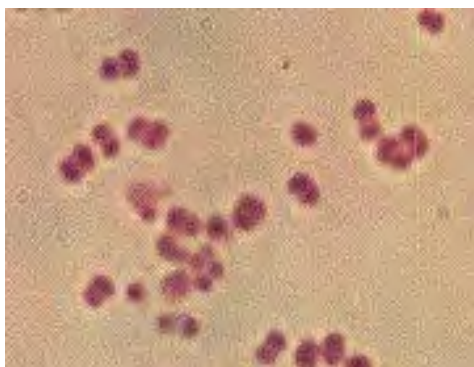


Figure 7 : Souches de *N. gonorrhoeae* dans une culture pure (11).

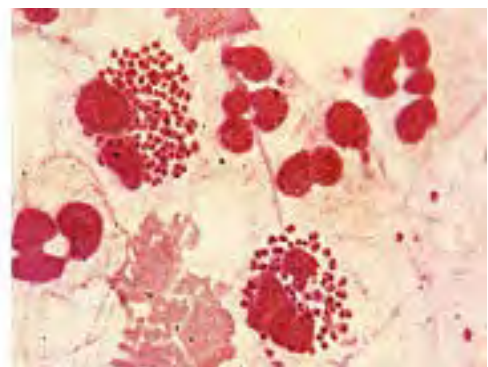


Figure 8: Souches de *N. gonorrhoeae* dans du pus de la gonorrhée.

#### II. 4. 4. Caractères biochimiques

*N. gonorrhoeae* possède une oxydase et une catalase comme toutes les *Neisseria*.

L'espèce peut métaboliser le glucose mais est sans action sur les milieux contenant les autres sucres étudiés (maltose, saccharose et le fructose).

Elle ne réduit pas les nitrates en nitrites.

#### II. 4. 5. Structure antigénique et facteurs de virulence

Les composants de la membrane de *N. gonorrhoeae* et leur rôle dans la virulence sont résumés dans le tableau 1

Tableaux 1 : Composants de la membrane de *N. gonorrhoeae* qui pourraient jouer un rôle dans la virulence (11)

Désignation	Emplacement	Contribution
PilE	Protéine majeure des fimbriae.	Initiation de l'adhésion aux cellules épithéliales.
P.II (Opa)	Protéine Opa.	Contribue à l'invasion.
P.I (Por)	Protéines perforantes de la membrane externe.	Préviendrait la formation du phagolysosome dans les neutrophiles et ou réduirait les brûlures.
LOS	Lipooligossacharide de la membrane externe	Provoque la réponse inflammatoire et déclenche la libération des TNF.
P.III (Rmp)	Protéine de la membrane externe.	Provoque l'inefficacité de la formation des anticorps. Ce qui bloque l'action bactéricide des anticorps contre P.I et les Lipooligossacharide
Tbp1 et Tbp2	Récepteurs membranaires externes de la transferrine	Acquisition du fer pour la croissance
Lbp	Récepteurs membranaires externes de la lactotransferrine	Acquisition du fer pour la croissance

#### **II. 4. 6. Réponse immune à *N. gonorrhoeae***

La gonococcie ne semble pas induire une immunité (Nauciel, 2000). *N. gonorrhoeae* présente une variabilité génétique par modification régulière de la structure de ses déterminants de virulence (pili, protéines PII...).

Lorsque l'hôte développe une réaction immunitaire vis-à-vis d'une protéine PII, le gonocoque élabore une nouvelle protéine PII jusque là inconnue du système immunitaire et cela peut se répéter plusieurs fois. Par ce mécanisme, les gonocoques peuvent persister dans les tissus en dépit de la mise en place d'une réponse immunitaire de l'hôte.

Cette variabilité génétique peut expliquer la chronicité des infections non traitées et l'absence de protection contre les réinfections. Elle permet aussi de comprendre les difficultés de la mise au point d'un vaccin. Les infections gonococciques disséminées sont liées à une déficience en certains composants du complément, en particulier C6, C7 et C8, qui entraîneraient une prédisposition aux infections à *N. gonorrhoeae*.

### **II. 5. Localisation et épidémiologie**

#### **II. 5. 1. Localisation**

*N. gonorrhoeae* est un parasite strict de l'homme, hôte des muqueuses des voies génitales de l'homme et de la femme.

#### **II. 5. 2. Epidémiologie.**

##### **II. 5. 2. 1. Transmission.**

*N. gonorrhoeae* est une bactérie très fragile. Elle résiste très peu dans le milieu extérieur. Sa transmission est strictement interhumaine et presque toujours vénérienne. La transmission par le linge est probablement à l'origine des cas de vulvo-vaginites des petites filles. Une transmission manuportée peut être la cause d'une ophtalmie. Chez le nouveau-né, l'infection est transmise à la délivrance.

##### **II. 5. 2. 2. Incidence et prévalence.**

Répandue dans le monde entier, l'infection à *N. gonorrhoeae* touche des sujets des deux sexes, de tous les âges et est fréquente chez les adolescents et les jeunes adultes sexuellement actifs. L'incidence est à la hausse dans le monde, mais à la baisse en Amérique du Nord, au Canada.

En Afrique, le gonocoque reste très fréquent avec des prévalences atteignant 3 à 7 % dans les populations générales et 40% des populations vulnérables (travailleuses du sexe).

Au Sénégal, la prévalence de l'infections à *N. gonorrhoeae* est de 7,1% chez les travailleuses du sexe, 5,4% chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes et 0,6 % chez les partenaires sexuels masculins des prostituées (Mboup *et al*, 2006). L'infection par ce germe multiplie par 2 le facteur de risque d'être infecté par le VIH chez les groupes à haut risque (Lalou *et al*, 2007).

## **II. 6. Pouvoir pathogène**

*N. gonorrhoeae* est l'agent causal de la gonorrhoeae.

Chez l'homme la bactérie est la cause d'urétrite, d'épididymite, d'orchite et de stérilité. Par contre chez la femme elle entraîne une cervicite, une endométrite, une salpingite, une infection génitale haute, la stérilité, la rupture prématurée des membranes ou une périhépatite. Chez ses hôtes des deux sexes, *N. gonorrhoeae* provoque rectite, pharyngite et gonococcie disséminée. Et chez le nouveau-né la bactérie est responsable de conjonctivite, de cicatrices cornéennes et de cécité.

## **II. 7. Manifestations cliniques**

### **II. 6. 1. Chez l'homme**

L'urétrite se manifeste par un écoulement purulent jaunâtre et des brûlures mictionnelles 3 à 5 jours après un rapport contaminant. L'extension de l'infection peut se faire à l'épididyme, aux vésicules séminales et à la prostate.

### **II. 7. 2. Chez la femme**

L'intensité des symptômes est très variable et la gonococcie est souvent asymptomatique.

Elle se manifeste par quelques lourdeurs pelviennes, une urétrite avec pollakiurie ou une cervicite avec des leucorrhées discrètes. Des complications sont possibles avec des salpingites et parfois une péritonite.

### **II. 7. 3. Chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes**

Ils se contaminent par coït anal passif (Wexner, 1990). La fréquence des formes asymptomatiques est élevée. La forme aiguë symptomatique des rectites qui apparaît 3 à 7 jours après le contact infectant se traduit par des douleurs anorectales importantes, des faux besoins des ténésmes, des émissions purulentes parfois sanglantes, des filaments de pus enrobant les selles ou un prurit anal.

Les formes mineures se limitent à une rectite hémorragique discrète ou à la présence de pus en filaments ou en plaques jaunâtres sur une muqueuse rectale normale.

#### **II. 7. 4. Complications générales**

Elles peuvent être des arthrites, des méningites, des endocardites et des manifestations cutanées qui relèvent d'une dissémination sanguine des gonocoques.

### **II. 8. Diagnostic biologique**

#### **II. 8. 1. Prélèvement**

Généralement, le prélèvement se fait soit au niveau des piliers de l'amygdale du pharynx, soit au niveau du rectum à l'aide d'un anoscope ou d'un rectoscope lubrifié

- Chez l'homme : on fait un prélèvement urétral par écouvillonnage ou à l'aide d'une curette ophtalmique. Dans les formes aiguës on prélève la sécrétion uréthroprostatique après massage très prudent de la prostate.
- Chez la femme : le prélèvement se fait comme suit :
  - ✓ Par écouvillonnage dans l'endocol ou éventuellement dans les culs de sac postérieurs après pose d'un spéculum sans lubrifiant.
  - ✓ A l'orifice méatique, soit par écouvillonnage, soit en exprimant une goutte de pus par pression de l'urètre contre la symphyse pubienne.
- Pour le diagnostic sérologique, c'est un prélèvement sanguin qui est effectué.

Si l'ensemencement n'est pas immédiat, il faut utiliser pour le transport des échantillons des milieux de transport comme le milieu de Young et Stuart, le Transglow ou le Jembec.

#### **II. 8. 2. Examen direct**

- Microscopie directe : les sécrétions sont étalées en couche mince et continue sur des lames d'histologie. Ce frottis est alors séché à l'air ou fixé à l'alcool puis coloré au Gram ou au bleu de méthylène. L'observation au microscope photonique en immersion permet la recherche des diplocoques à Gram négatif intra ou extracellulaires en « grain de café » caractéristiques de *N. gonorrhoeae*. On recherche également la présence des leucocytes et des polynucléaires

- Immunofluorescence directe et microscopie : le frottis est fixé à l'alcool méthylique (10 minutes) puis coloré par un immun sérum antigonocoque absorbé par des souches de méningocoques et de *Neisseria saprophytes*.
- Culture : le milieu actuellement préconisé est le milieu de Thayer et Martin. Il faut respecter les exigences de culture de la bactérie. Les colonies apparaissent après 24 à 36 heures d'incubation. Elles sont petites, surélevées, grisâtres, brillantes, opaques ou translucides et sont aérobies strictes (figure 7). L'identification repose sur la morphologie, les caractères métaboliques. *N. gonorrhoeae* se présente sous forme de diplocoques à Gram négatif « en grain de café », catalase positif, oxydase positive, glucose positif, maltose négatif et saccharose négatif.

### **II. 8. 3. Sensibilité aux antibiotiques**

Cefixime, ceftriscone, ciprofloxacine, ofloxacine et les céphalosporines et fluoroquinolones de troisième génération sont habituellement efficaces.

Le gonocoque est sensible à la streptomycine, à la tétracycline et à la ceftriaxone

La résistance aux antibiotiques est due au portage de plasmides dotés de gènes de résistance. Des cas de résistance aux fluoroquinolones (notamment à la ciprofloxacine et à la norfloxacine) ont été signalés (12).

### **II. 8. 4. Diagnostic immunologique**

Il s'agit essentiellement des réactions d'Immunofluorescence indirect (IFI) et d'hémagglutination avec un extrait de pili permettant la mise en évidence d'anticorps circulants. En IFI et en hémagglutination, un taux d'anticorps supérieur à 1/80 et un taux supérieur à 1/120 sont évocateurs d'une infection gonococcique (Coulaud *et al*, 1993).

## **II. 9. Traitement et prévention**

### **II. 9. 1. Traitement**

Les schémas thérapeutiques conseillés des urétrites et cervicovaginites utilisent : les aminosides (spectinomycine), les quinolones de deuxième génération (pefloxacine, ofloxacine, ciprofloxacine) et surtout la céphalosporine de troisième génération avec la céfoxitine et la céfotaxime qui ont donné d'excellents résultats. Cependant l'intérêt s'est concentré sur la ceftriaxone.

Les gonococcies oropharyngées ou rectales doivent bénéficier des mêmes molécules mais pendant 5 jours



Les gonococcemies sont traitées par la ceftriaxone : 1g/j en IM ou IV pendant 15 jours (Avril *et al*, 2000).

Il faut arrêter les rapports sexuels jusqu'à la guérison et diagnostiquer le ou les partenaire(s) sexuel(s) avant la reprise des rapports.

### **II. 9. 2. Prévention.**

Il n'existe pas de vaccin. Il ne faut pas faire de traitements antibiotiques systématiques car ils comportent plus de risques qu'ils n'apportent de résultats et entraînent une augmentation de la résistance des souches aux antibiotiques alors qu'il faut réserver les antibiotiques aux traitements curatifs. La prophylaxie sera essentiellement individuelle (antiseptiques vaginaux, condom, hygiène, méfiance) ou générale (éducation sanitaire, information, dépistage, visites périodiques des sujets à risques).

### **Chapitre III. Diagnostic moléculaire des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae***

Les patients infectés par *C. trachomatis* peuvent être infectés par *N. gonorrhoeae* et vice versa. Les infections à *C. trachomatis* peuvent ne pas être suffisamment sensibles aux schémas posologiques recommandés dans le traitement de *N. gonorrhoeae*. Par conséquent un traitement combiné pour les gonococcies et les infections à *C. trachomatis* est recommandé. Un diagnostic combiné de ces deux germes est alors important. Certaines techniques moléculaires permettent cela. En outre les techniques moléculaires permettent même de diagnostiquer ces infections à partir d'urines rendant le prélèvement moins contraignant par rapport aux méthodes classiques.

#### **III. 1. Hybridation moléculaire**

##### **III. 1. 1. Détection des ARNr de *Chlamydia trachomatis***

C'est la première technique de biologie moléculaire appliquée à la détection de *C. trachomatis*. Actuellement, un système commercialisé par Gen Probe utilise le principe de l'hybridation en milieu liquide pour le diagnostic direct de *C. trachomatis*. Il s'agit de la sonde Pace 2 trachomatis, Direct Probe Assay. La sonde marquée par un ester d'acridinium est complémentaire des ARNr, cible naturellement amplifiée de la bactérie. Sa sensibilité varie de 60 à 95% selon les auteurs. Des modifications récentes concernant le kit de prélèvement, la qualité du luminomètre et la mise en place d'un test de confirmation (PCA ou Probe Compétition Assay) ont permis d'augmenter la spécificité et la sensibilité.

##### **III. 1. 2. Détection de l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae***

C'est une technique d'hybridation moléculaire qui peut être réalisée à partir d'urines ou d'écouillons urétraux et endocervicaux. L'ARNr est détecté par l'utilisation d'une sonde ADN.

#### **III. 2. Techniques utilisant l'amplification de l'ADN**

##### **III. 2. 1. La ligase Chain Reaction (LCR)**

C'est une technique qui amplifie les séquences nucléotidiques dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis*. Elle amplifie aussi les séquences nucléotidiques de l'ADN génomique de *N. gonorrhoeae*.

##### **III. 2. 2. La Transcription Mediated Amplification (TMA)**

Elle utilise la sous unité 16S de l'ARN ribosomal pour la détection de *C. trachomatis*.

### **III. 2. 3. La Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Cette technique amplifie les séquences nucléotidiques dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis*. Elle amplifie également des séquences nucléotidiques du génome de *N. gonorrhoeae*.

#### **III. 2. 3. 1. Historique de la PCR**

La PCR a été inventée en 1985 par Kary Mullis. Depuis lors, elle a grandement évolué. En 1991, il y a eu la première utilisation de sonde (sonde d'hydrolyse) en PCR publiée par Holland *et al.* En 1992, la première détection du produit PCR en temps réel a été faite à l'aide d'un marquage au BET par Higuchi *et al* (13).

#### **III. 2. 3. 2. Principe de la PCR**

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Chaque cycle comprend plusieurs étapes : une condition native, une dénaturation, une hybridation et une élongation.

##### **III. 2. 3. 2. 1. Composés utilisés en PCR**

Les composés utilisés sont : l'ADN matrice qui contient la séquence à amplifier, les amorces oligonucléotides qui repèrent cette matrice et servent d'amorces pour l'ADN polymérase, une ADN polymérase thermostable et les désoxyribonucléotides triphosphates correspondant aux quatre bases de l'ADN et constituant les substrats de l'ADN polymérase (Winter, 2000).

##### **III. 2. 3. 2. 2. Différentes étapes de la PCR (figure 9)**

###### **➤ Condition native (figure 9, n°0)**

Elle se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice. Dans notre exemple nous considérons qu'il n'y a qu'une seule molécule initiale d'ADN double brin dans la solution. La zone colorée (rose et orange) correspond à notre amplicon.

###### **➤ Dénaturation initiale (figure 9, n°1')**

C'est une étape de chauffage, généralement de 10 à 15 minutes à 95°C, avant la PCR proprement dite. Elle permet de dénaturer l'ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution.

➤ Phase de dénaturation (figure 9, n°1)

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95°C) permet de déshybrider l'ADN, de « décrocher » les polymérase qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

➤ Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (figure 9 n°2)

Cette étape (généralement de 2 à 60 secondes à 56-64°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider à l'ADN matrice grâce à une température qui est thermodynamiquement favorable.

➤ Phase d'élongation (figure 9, n°3)

Cette étape (généralement de 4 à 120 secondes à 72°C) permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dinucléotides triphosphates (dNTPs) libres présents dans le milieu réactionnel.

Les trois dernières phases se déroulent de la même manière durant chaque cycle sauf que certaines polymérase arrivées au bout de leur ADN matrice se décrochent spontanément. A la fin du cycle 2 il y a tous les types de brins d'ADN qui existeront lors de la PCR, à savoir :

- Les brins d'ADN natifs (A, F).
- Les brins d'ADN précisément définis à leur extrémité 5'seulement (2B, 2D).
- Les brins d'ADN correspondant à l'amplicon c'est-à-dire précisément définis à leurs deux extrémités (C, E).

A la fin du cycle 4 l'amplicon, cible qui apparaît à la fin du troisième cycle devint la combinaison majoritaire. Dès le dixième cycle, les molécules contenant la séquence à amplifier représentent près de 99% de l'ensemble.

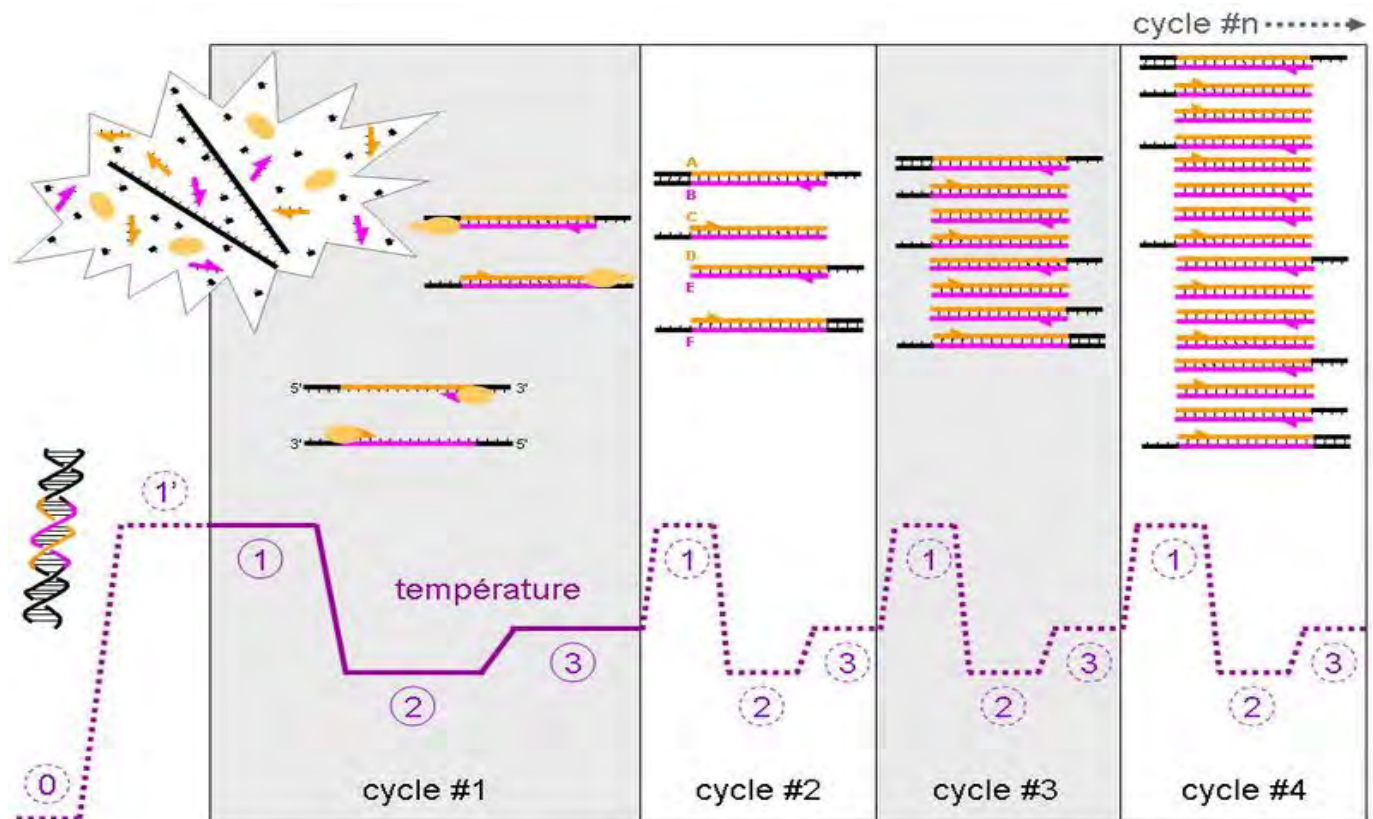


Figure 9 : Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR (14).

### III. 2. 3. 2. 3. PCR classique et PCR en temps réel

#### III. 2. 3. 2. 3. 1. Graphique de l'amplification par PCR en temps réel (figure 10)

Le graphique de l'amplification est le graphique du signal fluorescent ou la courbe de croissance de la fluorescence par PCR en fonction du nombre de cycles. Aux cours des cycles initiaux de la PCR, la réaction de PCR progresse de manière exponentielle. Cependant, le nombre de copies cibles est faible. Par conséquent, le signal fluorescent change peu ou de manière indétectable. Cette région est généralement appelée région de ligne de base. Au fur et à mesure de l'évolution du cyclage, le signal de fluorescence s'élève et croît de manière exponentielle. Le taux de croissance commence à ralentir et présente plusieurs cycles de croissance linéaire. Finalement, la croissance du signal ralentit de plus en plus et la phase plateau débute.

- Phase exponentielle : des duplications exactes du produit s'accumulent à chaque cycle. La réaction est spécifique et précise.

- Phase linéaire : la réaction ralentit en raison de l'accumulation du produit. Les composants de la réaction sont utilisés
- Phase plateau : les composants freinant la réaction sont épuisés. La réaction est effectivement terminée, aucun produit spécifique supplémentaire n'est créé.

En PCR classique, la détection se fait après l'amplification. Par contre pour la PCR en temps réel la détection se fait au moment de l'élongation, ce qui délimite une plage de détection limitée par la ligne de base et la phase plateau.

### III. 2. 3. 2. 3. 2. Exemple de détection par PCR en temps réel (figure 11)

Au cours de chaque cycle de l'amplification par PCR., des sondes fluorescentes s'hybrident avec l'ADN cible, si celui-ci est présent. Les sondes sont des oligonucléotides ADN linéaire simple brin modifié. Une fraction fluorescente étant liée de manière covalente à une extrémité de la sonde (fluorophore) et une fraction désactivée (quencher) à l'autre extrémité.

En l'absence de séquences cibles, les sondes adoptent une conformation telle que le quencher se trouve assez près du fluorophore excité pour pouvoir absorber son énergie avant qu'une émission fluorescente ne soit possible.

Lorsque la sonde se lie à la séquence complémentaire dans la cible, le fluorophore et le quencher sont séparés afin de permettre l'émission fluorescente et la détection par fluorescence. Cette fluorescence survenant au cours de chaque cycle, la réaction PCR peut être lue en temps réel.

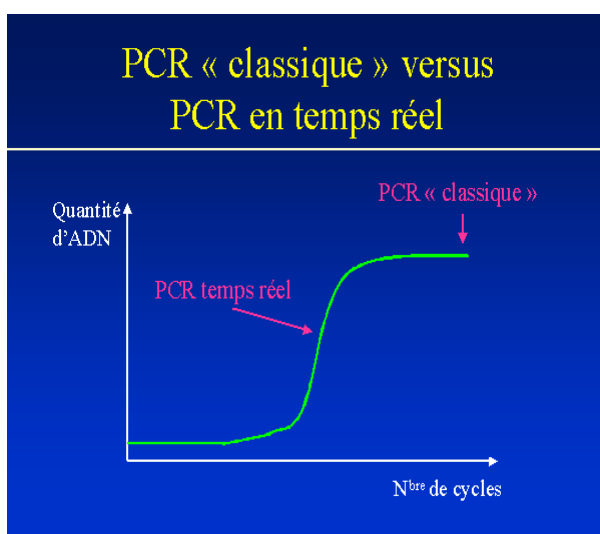


Figure 10 : Graphique de l'amplification par PCR en temps réel (15)

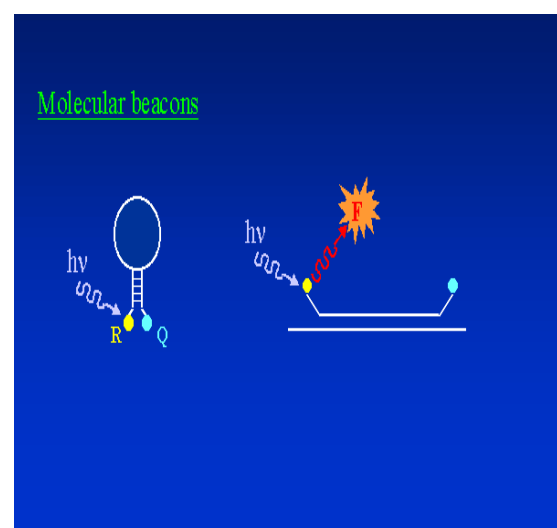


Figure 11 : Détection par fluorescence en temps réel (15)

Ces techniques moléculaires sont très sensibles, modernes, rapides, automatisables. Plusieurs techniques moléculaires existent aujourd'hui dont le Cobas Amplicor des laboratoires de Roche et le M2000 Abbott Real time.

### **III. 2. 3. 3 Cobas Amplicor des laboratoires Roches**

C'est le premier système automatisé de biologie moléculaire. Le système Cobas Amplicor comporte huit élément électromécaniques principaux : (annexe 4).

#### **Principe du Cobas Amplicor**

Le test Cobas Amplicor CT/NG est un test multiplex qui permet d'amplifier simultanément l'ADN de *C. trachomatis*, de *N. gonorrhoeae* et du contrôle interne. Il comporte 4 opérations principales : la préparation des échantillons, l'amplification de l'ADN cible par PCR à l'aide d'amorces complémentaires spécifiques de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, l'hybridation de l'ADN amplifié avec des sondes oligonucléotides spécifiques des cibles et la détection de l'ADN amplifié lié aux sondes par développement d'une coloration.

### **III. 2. 3. 4. m2000 Abbott real time**

Il est constitué de deux appareils séparés : le m2000sp et le m2000rt (annexe 5 et 6).

#### **Principe du m2000**

Le test m2000 Abbott real time est un test entièrement automatisé qui se déroule dans deux appareils : le m2000sp et le m2000rt.

L'appareil m2000sp automatise entièrement l'extraction de l'ADN. Le système utilise la technologie des particules magnétiques pour capter les acides nucléiques et laver les particules afin d'éliminer tout composant non lié de l'échantillon. Les acides nucléiques liés sont élués et transférés avec le mélange réactionnel automatiquement préparé vers une plaque de 96 puits profonds.

La PCR se déroule à l'intérieur du m2000rt. Les séquences cibles CT/NG présentes à chaque cycle d'amplification sont amplifiées et détectées à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence, sans qu'il y ait besoin d'ouvrir la plaque scellée. Les sondes ne génèrent aucun signal, à moins d'être spécifiquement liées au produit amplifié.

## **Travail personnel**



## **Chapitre I : Cadre géographique, période et population d'étude**

### **I. 1. Cadre géographique et période d'étude**

#### **I. 1. 1. Enquête et prélèvements**

L'ensemble de nos enquêtes et prélèvements se sont déroulés durant la période allant du 10 Février au 10 Décembre 2007. Ils ont eu pour cadre :

- L'unité de bactériologie du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec.

Ce laboratoire constitue le centre national de référence pour le diagnostic du SIDA et des IST. Il est également le laboratoire de référence OMS pour le VIH2 et centre collaborateur ONUSIDA. Il assure le contrôle de qualité des laboratoires de la sous région et constitue un centre de formation et d'expertise pour les laboratoires régionaux ainsi que ceux des pays limitrophes.

Il comprend : une unité de bactériologie, une unité de virologie, une unité d'Immunologie et une unité de biologie moléculaire.

- Les locaux des instituts d'hygiène sociale de Dakar, Thiès, Mbour et Saint-Louis.
- Quelques sites confidentiels disséminés sur le territoire national.

#### **I. 1. 2. Traitement des échantillons**

L'étude de nos prélèvements et données d'enquêtes s'est faite à l'unité de Biologie moléculaire du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec entre le 23 Octobre 2007 et le 19 Mars 2008.

### **I. 2. Population d'étude**

La population d'étude est constituée de 168 sujets Sénégalais, répartis comme suit :

- 60 femmes provenant de la population générale, venues consulter pour un bilan gynécologique au laboratoire de Bactériologie-Virologie.
- 48 travailleuses du sexe recensées dans le cadre de l'Enquête Nationale de Surveillance Combinée des IST et du VIH/SIDA (ENSC) 2007.
- 60 Sujets provenant de la population des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes recensés dans le cadre de l'enquête sur les MSM 2007.

Le choix des travailleuses du sexe (TS) et des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes se justifie par leur comportement à haut risque de contamination et de

transmission des infections sexuellement transmissibles. Quant à la population générale, elle constitue un groupe à moindre risque, mais elle est néanmoins concernée.

## **Chapitre II : Matériel et réactifs utilisés**

### **II. 1. Matériel biologique**

Il est constitué de :

- 60 prélèvements d'urines provenant des femmes de la population générale.
- 13 prélèvements par écouvillonnage endocervical provenant aussi de ces femmes.
- 48 prélèvements par écouvillonnage endocervical chez les travailleuses du sexe.
- 60 prélèvements d'urines en provenance des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes.

### **II. 2. Matériel et réactifs de laboratoire (détails annexe 1)**

#### **II. 2.1. Matériel pour la technologie Cobas Amplicor**

- Analyseur Cobas Amplicor (annexe 3 et 4)

#### **II. 2. 2. Réactifs pour la technologie Cobas Amplicor**

- Réactifs de préparation des échantillons
- Réactifs d'amplification
- Réactifs de détection

#### **II. 2. 3. Matériel pour la technologie m2000**

- Extracteur automatique m2000sp (annexe 5)
- Analyseur m2000rt (annexe 6)

#### **II. 2. 4. Réactifs pour la technologie m2000**

- Réactifs d'extraction de l'ADN
- Réactifs d'amplification
- Réactifs de contrôles

### **Chapitre III : Méthodes d'étude**

Pour la population générale, les participants à l'étude étaient des patients qui se présentaient au laboratoire pour un bilan gynécologique. Ils étaient avertis pour respecter les principes suivants :

- Pas de toilette intime, pas de règles et pas de rapport sexuels la veille du prélèvement.
- Les urines sont prélevées au moins une heure après miction.

#### **III. 1. Population générale**

##### **III. 1. 1 Accueil et enquête**

Les patients étaient accueillis à l'unité de bactériologie et soumis à questionnaire portant sur les caractéristiques sociodémographiques, le motif de la prescription, le suivi ou non d'un traitement et les produits utilisés, l'événement auquel sont liés les symptômes locaux, les symptômes généraux et les contraceptifs utilisés.

##### **III. 1. 2. Prélèvement, transport et conservation des échantillons**

Avant prélèvement, une fiche d'examen est remplie pour chaque patient.

Pour la population générale, le prélèvement a été fait comme suit :

- Les patients étaient en position gynécologique.
- Un spéculum vaginal était introduit dans le vagin pour visualiser le col. Puis, on introduit un écouvillon dans le col et on imprime à celui-ci un mouvement de rotation pendant quelques secondes pour lui permettre de s'imprégner de la sécrétion. A la sortie, l'écouvillon est immédiatement placé dans un tube de 5 ml contenant un liquide de transport. La mesure du pH a été faite à l'aide d'un papier pH mis en contact avec la sécrétion vaginale sur le spéculum et reporté sur les fiches.

Il est ensuite demandé au patient de se rendre dans les toilettes pour sa toilette intime avant de recueillir le premier jet d'urines dans un pot en plastique. Les urines sont alliquotées sur place à l'aide de pipettes de transfert dans des tubes de 5ml contenant le liquide de transport.

Tous ces prélèvements sont ensuite immédiatement transportés dans des glacières à l'unité de biologie moléculaire. Ils sont congelés à -20°C.

### **III. 2. Travailleuses du sexe (TS) et hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (MSM)**

L'enquête et les prélèvements chez les travailleuses du sexe ont été faits lors de l'Enquête Nationale de Surveillance Combinée des IST et du VIH/ SIDA (ENSC) 2007 et les échantillons étaient conservés au laboratoire à -80°C.

De même pour les MSM, enquête et prélèvements ont été faits lors de l'enquête sur les MSM en 2007 et les échantillons étaient également gardés au laboratoire à -20°C.

### **III. 3. Détection avec le Cobas Amplicor**

#### **III. 3. 1. Principe du Cobas Amplicor**

Le test Cobas Amplicor CT/NG est un test multiplex qui permet d'amplifier simultanément l'ADN de *C. trachomatis*, de *N. gonorrhoeae* et du contrôle interne.

Il comporte quatre opérations principales : la préparation des échantillons, l'amplification de l'ADN cible par PCR à l'aide d'amorces complémentaires spécifiques de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, Hybridation de l'ADN amplifié avec des sondes oligonucléotides spécifiques des cibles et détection de l'ADN amplifié lié aux sondes par développement d'une coloration.

#### **III. 3. 2. Mode opératoire (détails annexe 8)**

##### **III. 3. 2. 1. Préparation des échantillons**

La préparation des échantillons a été manuellement faite et la procédure est la suivante :

##### **➤ Les échantillons d'urines**

Les échantillons d'urines sont d'abord décongelés à la température ambiante, lavés puis centrifugés pour concentrer les cellules au fond des tubes. Après avoir enlevé le surnageant, une solution de lyse a été ajoutée pour libérer le matériel génétique. Une solution de diluant a été ajoutée puis les échantillons sont centrifugés une deuxième fois.

##### **➤ Les échantillons d'écouillons endocervicaux**

Les échantillons ont été d'abord décongelés à la température ambiante puis une solution de lyse a été ajoutée pour libérer le matériel génétique et en fin une solution de diluant a été ajoutée.

### **III. 3. 2. 2. Préparation des contrôles**

Nous avons mélangé chaque contrôle avec une solution de diluant pour préparer des solutions dites intermédiaires. A ces solutions a été ajoutée une solution de lyse et les contrôles étaient ainsi préparés. Le contrôle positif de CT équivaut au contrôle négatif de NG et vice versa.

### **III. 3. 2. 3. Préparation du mélange réactionnel**

Au mélange réactionnel du kit a été ajouté son activateur.

### **III. 3. 2. 4. Préparation des cassettes**

A chaque cassette a été ajouté l'activateur correspondant si c'est nécessaire.

### **III. 3. 2. 5. Préparation de la solution de lavage**

Nous avons ici dilué la solution de lavage et rempli le réservoir de l'appareil avec la solution diluée.

### **III. 3. 2. 6. Mise en plaque**

Dans les tubes d'amplifications des couronnes A, nous avons mélangé chaque échantillon avec le mélange réactionnel activé.

### **III. 3. 2. 7. Transfert des couronnes A et des cassettes à l'analyseur Cobas Amplicor**

Les couronnes et les cassettes sont identifiées par code barre.

Les couronnes prêtes pour analyse PCR et les cassettes contenant les réactifs adéquats sont chargées dans le système (figures 12, 13 et 14.). Les données de liste de travail et les ordres sont introduits par l'utilisateur et le système est lancé.

Le système comporte un mécanisme de transfert. Celui-ci comprend une pointe de transfert qui assure le pipetage de quantités spécifiées d'échantillons amplifiées et de réactifs (figure 15), et mesure les niveaux des différents réactifs. Cette pointe de transfert est lavée minutieusement avant et après chaque pipetage. Le mécanisme de transfert comprend également un manipulateur de cuvette D qui transfère les cuvettes D vers le portoir à cuvette D, l'incubateur, la station de lavage et le photomètre.



Figure : 12. Chargement des couronnes d'échantillons.



Figure : 13 Couronne chargée dans le module d'amplification.



Figure:14 Identification par code barre des cassettes.



Figure : 15 Pipetage de réactif.

### III. 3. 3. Recherche de CT/NG par l'appareil

#### III. 3. 3. 1. Régions cibles

- *C. trachomatis* : le test Cobas Amplicor utilise les amorces biotinylés CP24 et CP27 pour définir une séquence d'ADN de 207 nucléotides localisés dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis* qui est commun à tous ces sérotypes.
- *N. gonorrhoeae* : la cible définie par les amorces SS01 et SS02 est constituée de 201 nucléotides situés dans le gène de l'ADN méthyltransférase de *N. gonorrhoeae*. Cette séquence est présente chez toutes les souches de *Neisseria* pathogènes pour l'homme.

#### III. 3. 3. 2. Déroulement du test avec l'appareil Cobas Amplicor (annexe 11)

Le Cobas Amplicor fait une amplification sélective pour détruire toute trace d'ADN et une amplification de l'ADN cible. Les amplicons de l'ADN cible sont ensuite dénaturés puis hybridés avec des particules magnétiques revêtues de sondes. La détection se fait par le développement d'une coloration et mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 660 nm.

### III. 3. 3. 3. Contrôle de qualité interne

Deux témoins CT positif et NG positif sont inclus dans chaque série PCR. Les témoins positifs pour CT et NG servent respectivement de contrôles négatifs pour NG et CT. Il y a également un contrôle interne pour une éventuelle inhibition.

### III. 3. 3. 4. Validité des résultats

Pour les témoins négatifs, la densité optique doit être inférieure à 0.2.

Pour les témoins positifs, la densité optique doit être supérieure à 2.00.

### III. 3. 3. 5. Interprétation des résultats

Des plages de valeurs sont intégrées dans le système qui fait l'interprétation selon celles-ci et donne directement les résultats

Ces plages de valeurs sont consignées dans les tableaux 2 et 3

➤ Tableau 2 : Interprétation des résultats pour *C. trachomatis* avec le Cobas

Résultats DO		Interprétation des résultats	Manipulation supplémentaire lorsque c'est nécessaire
CT	IC		
<0.2	≥0.2	Résultat CT négatif	
<0.2	<0.2	Résultat non interprétable (inhibiteur)	Reprendre procédure en simple.
≥0.2 et<0.8	Tous	Résultat douteux	Reprendre procédure en duplicata
≥0.8	Tous	Résultat CT positif	

➤ Tableau 3 : Interprétation des résultats pour *N. gonorrhoeae* avec le Cobas

Résultats DO		Interprétation des résultats	Manipulation supplémentaire lorsque c'est nécessaire
NG	IC		
<0.2	≥0.2	Résultat NG négatif	
<0.2	<0.2	Résultat non interprétable (inhibiteur)	Reprendre procédure en simple
≥0.2	Tous	Résultat NG positif	Reprendre procédure en duplicata



Reprise de la procédure en simple : il faut reprendre l'analyse après chauffage. Si le résultat de IC reste le même, l'échantillon est ininterprétable. Par ailleurs, se référer aux tableaux précédents.

Reprise de la procédure en duplicata : il faut laisser un espace sur le portoir en y remettant l'échantillon préparé. Si au moins 2 des 3 résultats sont  $\geq 0.2$ , l'échantillon est positif. Si seul le premier résultat est  $\geq 0.2$ , l'échantillon est négatif à condition que pour IC, DO soit  $\geq 0.2$ .

Résultats NG positifs et repris en duplicata : si 2/3 des résultats sont  $< 0.2$  l'échantillon est négatif à condition que les résultats des tests IC soient  $\geq 0.2$ . Si 2/3 ou l'ensemble des résultats sont  $\geq 2.00$  l'échantillon est positif. Si 2/3 ou l'ensemble des résultats sont  $\geq 0.2$  mais sans rencontrer le critère précédent, le résultat est douteux.

### **III. 4. Détection avec le m2000 Abbott real time**

#### **III. 4. 1. Principe du m2000**

Le test m2000 Abbott real time est un test entièrement automatisé et se déroule dans deux appareils : le m2000sp et le m2000rt (annexe 5, 6, et 7).

L'appareil m2000sp automatise entièrement l'extraction de l'ADN. Le système utilise la technologie des particules magnétiques pour capter les acides nucléiques et lave les particules afin d'éliminer tout composant non lié de l'échantillon. Les acides nucléiques liés sont élués et transférés avec le mélange réactionnel automatiquement préparé vers une plaque à 96 puits profonds.

La PCR se déroule à l'intérieur du m2000rt. Les séquences cibles CT/NG présentes à chaque cycle d'amplification sont amplifiées et détectées à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence, sans qu'il y ait besoin d'ouvrir la plaque scellée. Les sondes ne génèrent aucun signal, à moins d'être spécifiquement liées au produit amplifié.

#### **III. 4. 2. Mode opératoire**

##### **III. 4. 2. 1. Etapes manuelles dans la préparation des échantillons (annexe 9)**

Les échantillons sont décongelés et chacun est mis dans une cupule réactionnelle.

Les cupules et tubes de contrôles sont placés dans les portoirs d'échantillons selon un ordre bien défini. En respectant cet ordre les numéros des échantillons sont entrés par l'utilisateur dans le centre de contrôle.

Les solutions de lyse, de microparticules, de lavages, et d'élution utilisables une seule fois sont mises dans des cuvettes de réactifs placées dans leurs portoirs. Le contrôle interne est ajouté dans le tampon de lyse et l'alcool dans la solution de lavage 2. Le portoir de l'unité de traitement 1ml est chargé de cupules réactionnelles vides. Les portoirs d'échantillons (figure 16 n°1), de cuves de réactifs (figure 16 n°2) et l'unité de traitement 1ml (figure 16 n°3) sont chargés dans le système m2000sp. Une plaque à 96 puits profonds est placée sur la plate-forme de déchargement. Des embouts à filtre de 1000 et de 200 sont chargés sur les portoirs d'embouts et dans les étagères aussi comme réserve. L'appareil possède un lecteur code barre qui lie les codes des échantillons et des réactifs. Il possède également un bras manipulateur du portoir de l'unité de traitement 1ml dans les différentes zones de cette unité (zone de chauffage 1, zone de chauffage 2, zone à température ambiante et zone magnétique) et de boîtes d'embouts. Le bras distributeur d'échantillons et de réactifs, terminé par 8 Diti cône saisit à chaque fois 8 embouts différentes de sorte que pour chaque échantillon est utilisé un embout unique pour une addition quelconque de réactif. On lance d'abord une procédure d'extraction de l'ADN des échantillons à partir du centre de contrôle puis une procédure d'addition du mélange réactionnel après avoir placé une plaque de réaction optique à 96 puits sur la plate-forme de déchargement, le mélange réactionnel et un tube de mélange réactionnel dans le coffret réactif de dosage (figure 16 n°4).



Figure16 : Transfert des portoirs et des plaques dans le système m2000sp.

Légende :

1. Transfert des portoirs d'échantillons.
2. Transfert des portoirs de cuves de réactifs.
3. Transfert du portoir de l'unité de traitement 1ml.
4. Placement de la plaque à 96 puits profonds, de la plaque de réaction optique à 96 puits et du coffret réactif de dosage.

Après extraction et préamplification, cette plaque est scellée (figure 17 n°5') et transférée dans le m2000rt où elle est placée sur le plateau de la plaque à PCR du m2000rt (figure 17 n°5).



Figure 17 : Transfert de la plaque de réaction optique à 96 puits au système m2000rt.

5'. La plaque est scellée.

5. Pose de la plaque de réaction optique sur le plateau. .

### III. 4. 3. Recherche de CT/NG par PCR

#### III. 4. 3. 1. Régions cibles

- Pour *C. trachomatis* : Le test M200 cible une séquence de 102 paires de bases localisées dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis*. Ce plasmide est hautement conservée dans tous les sérovars de *C. trachomatis* mais ne se trouvent pas dans d'autres espèces.
- Pour *N. gonorrhoeae* : les deux amorces ciblent une région des gènes Opa. La séquence comprenant 122 paires de bases a été sélectionnée comme ADN cible car elle est conservée dans toutes les souches de *N. gonorrhoeae* étudiées et n'est pas présente dans les *Neisseria* qui causent des maladies non sexuellement transmissibles.

#### III. 4. 3. 2. Déroulement du test avec le m2000 (annexe 10)

L'appareil m2000sp procède d'abord à une extraction de l'ADN, puis prépare le mélange réactionnel et en fin fait la préamplification dans une plaque de réaction optique à 96 puits.

La plaque est transférée au m2000rt où se déroule l'amplification et la détection de l'ADN cible par fluorescence.

#### III. 4. 3. 3. Contrôle de qualité interne

Un contrôle interne, un contrôle négatif et deux contrôles seuils sont introduits dans chaque série de PCR et subissent l'intégralité de la procédure.

#### III. 4. 3. 4. Validité des résultats

Le nombre de cycle du contrôle interne doit être compris dans une plage de valeurs établie dans l'appareil. Le nombre de cycle moyen des deux contrôles seuils doit aussi être compris dans une plage de valeurs établie également dans l'appareil.

### **III. 4. 3. 5. Interprétation des résultats**

Pour chaque substance analysée (CT ou NG), le logiciel calcule le nombre de cycles (NC) moyen des deux contrôles seuils, puis ajoute à cette moyenne un nombre prédéterminé de cycles de façon à générer le cycle de décision seuil (CO) ; si l'échantillon testé génère un NC inférieur ou égal au CO, une interprétation positive et un résultat numérique supérieur ou égal à zéro sont rapportés. Le résultat numérique (cycle delta ou CD) correspond à la différence en nombre de cycles entre le CO et le NC. Les échantillons négatifs ne génèrent aucune amplification et la valeur de CD qui est égale à -1 est affichée par défaut par l'appareil. Les échantillons qui génèrent un NC strictement supérieur au CO sont accompagnés d'un code d'erreur et doivent être retestés.

### **III. 5. Traitement des résultats**

#### **III. 5. 1. Appréciation des tests**

Cette appréciation de la validité intrinsèque des tests a été faite par le calcul de la sensibilité et de la spécificité des tests qui sont exprimées en pourcentage. Les tests très sensibles sont utiles pour s'assurer qu'une maladie n'est pas présente (peu de faux-négatifs) et les tests très spécifiques sont utiles pour s'assurer qu'une maladie est absente (peu de faux-positifs).

Nous avons également mesuré la capacité des tests à prédire si la maladie est présente par le calcul des valeurs prédictive positive et prédictive négative également exprimées en pourcentage.

#### **III. 5. 1. 1. Définitions**

La sensibilité (Se) d'un test représente le pourcentage de vrais positifs (VP) parmi les malades. Elle correspond à la probabilité que le test soit positif chez les malades.

La spécificité (Sp) d'un test représente le pourcentage de vrais négatifs (VN) parmi les non malades. Elle correspond à la probabilité que le test soit négatif chez les non malades.

La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif.

La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif.

### III. 5. 1. 2. Expressions littérales.

Les résultats de tests quelconques sont inscrits dans le tableau suivant 4

Tableau 4 : Résultats des tests quelconques.

	Positifs	Négatifs
Microorganisme présent	Vrais-positifs (VP)	Faux-négatifs (FN)
Microorganisme absent	Faux-positifs (FP)	Vrais-négatifs (VN)

Les expressions littérales sont données par les relations suivantes :

$$Se = VP / (VP + VN) \times 100 \text{ et } Se \text{ moyenne (Sem)} = 1/n \sum Se_i$$

$$Sp = VN / (VN + FP) \times 100 \text{ et } Sp \text{ moyenne (Spm)} = 1/n \sum Sp_i$$

$$VPP = VP / (VP + FP) \times 100 \text{ et } VPP \text{ moyenne (VPPm)} = 1/n \sum VPP_i$$

$$VPN = VN / (FN + VN) \times 100 \text{ et } VPN \text{ moyenne (VPNm)} = 1/n \sum VPN_i$$

n = effectif de Se, Sp, VPP ou de VPN.

### III. 5. 2. Analyse statistique.

Nous avons une variable qualitative à deux modalités. Le test  $\pi^2$  n'est pas applicable à nos résultats puisque les effectifs théoriques ( $n_{ij}$ ) ne sont pas tous supérieurs ou égal à cinq.

C'est le test kappa que nous avons utilisé. Le test kappa permet de déceler l'accord ou le désaccord entre des jugements qualitatifs appariés et de chiffrer l'intensité ou la qualité de celui-ci.

Dans le cas d'une étude d'accord entre deux observateurs statistiquement indépendants ayant r modalités de jugements, avec r supérieur ou égale à deux comme dans notre cas, le coefficient kappa est applicable et s'écrit :

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

$P_o$  = la proportion d'accord observée.

$P_e$  = la proportion d'accord aléatoire ou concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance des jugements.

Les tableaux 5 et 6 présentent la notation utilisée lorsque les données sont présentées dans un tableau de contingence.

Tableau 5 : Proportions jointes des jugements de deux juges sur une échelle avec r catégories.

		Technique A.				
Technique B.	Catégories.	1	2	...	r	Total
	1	P11	p12	...	p1r	p1.
	2	p21	p22	...	p2r	p2.
	r	pr1	pr2	...	pr	pr.
	Total	p.r	p.2	...	p.r	1

Tableau 6 : Effectifs joints des jugements de deux juges sur une échelle avec r catégories.

		Technique A.				Total	
		1	2	...	r		
Technique B.	Catégories.	1	n11	n12	...	n1r	n1.
		2	n21	n22	...	n2r	n2.
		r	nr1	nr2	...	nrr	nr.
Total			n.r	n.2	...	n.r	n

On appelle concordance observée  $P_o$  la proportion des individus classés dans les cases diagonales de concordance du tableau de contingence, soit la somme de ces effectifs diagonaux divisée par la taille de l'échantillon (n).

$$P_o = \sum_{i=1}^r P_{ii} = (1/n) \sum_{i=1}^r n_{ii}$$

Et la concordance aléatoire  $P_e$  qui est égale à la somme des produits des effectifs marginaux divisée par le carré de la taille de l'échantillon.

$$Pe = \sum_{i=1}^r P_{i.i} = (1/n^2) \sum_{i=1}^r n_{i.i}$$

L'analyse statistique des résultats avec le test Kappa se fera de la façon suivante:

- Hypothèses :
  - ✓  $H_0$  : pas accord entre les deux techniques ( $K=0$ ).
  - ✓  $H_1$  : accord inter techniques ( $K>0$ ).
- Calcul de K.
- Conclusion statistique.
- Appréciation de K en utilisant le classement de l'accord en fonction de la valeur kappa proposé par Landis et Koch (tableau 7)

Tableau 7 : Degré d'accord et valeur de Kappa.

Accord	Kappa
Excellent	$\geq 0,81$
Bon	0,80-0,61
Modéré	0,60-0,41
Médiocre	0,40-0,21
Mauvais	0,20-0,0
Très mauvais	$< 0,0$

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### IV.1. Résultats

#### IV. 1. 1. Résultats comparés sur les populations cibles

La population d'étude était constituée par des sujets provenant :

- De la population générale dont on a obtenu des prélèvements d'urines et des prélèvements par écouvillonnage endocervical
- Des travailleuses du sexe qui ont subi dans le col utérin des prélèvements par introduction d'écouvillons.
- Des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes dont on a obtenu des prélèvements d'urines.

Aucun résultat positif n'a été décelé chez la population générale. Cependant chez les travailleuses du sexe il y a eu 3 cas positifs dont 2 positifs NG et un cas de co-infection (tableau 8 et figure 18). Et chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes il y a eu 22 positifs dont 10 positifs CT, 8 positifs NG et 4 cas de co-infections (tableau 9 et figure 19).

Tableau 8 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements par écouvillonnage endocervical

Echantillons écouvillons	Positifs CT	Positifs NG	Positifs CT/NG	Négatifs	Total testé
Population générale	0	0	0	13	13
Travailleuses du sexe	0	2	1	45	48



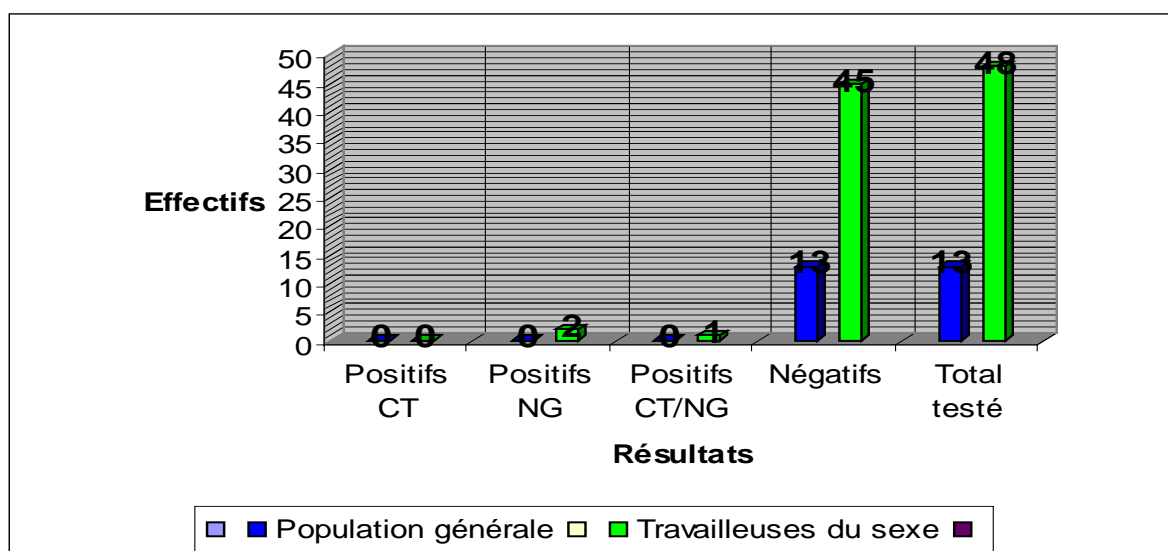
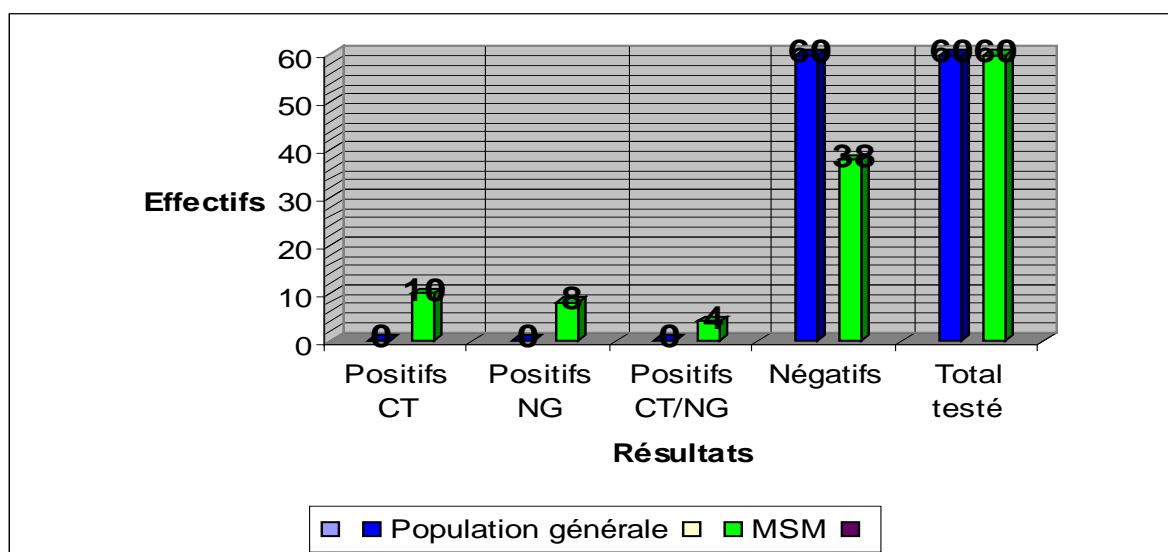


Figure 18 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements par écouvillonnage endocervical.

Tableau 9 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements d'urines.

Echantillons Urines	Positifs CT	Positifs NG	Positifs CT/NG	Négatifs	Total testé
Population générale	0	0	0	60	60
MSM	10	8	4	38	60



Figures 19 : Résultats comparés sur les populations cibles pour les prélèvements d'urines.

## IV. 1. 2. Résultats de la détection par les deux techniques

### IV. 1. 2. 1. Comparaison des résultats Cobas Amplicor/m2000 par population cible

Tous les échantillons testés (60 d'urines et 13 par écouvillonnage endocervical) de la population générale sont négatifs avec les deux techniques (tableau 10 et figures 20 et 21).

En ce qui concerne les prélèvements par écouvillonnage endocervical des travailleuses du sexe, les deux techniques ont abouti aux mêmes résultats. Il y a eu sur 48 échantillons testés, un échantillon positif CT et NG, et 2 positifs NG (tableau 10 et figure 22).

Chez les MSM par contre, il y a eu sur 60 échantillons testés, 10 positifs CT avec le Cobas dont les 9 étaient positifs avec le m2000, 8 positifs NG avec le Cobas, dont les 7 étaient positifs avec le m2000 et 4 positifs CT et NG avec les deux techniques (tableau 10 et figure 23)

Tableau 10 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 par population cible et type de prélèvement.

Population	Technique	Positifs CT	Positifs NG	Positifs CT/NG	Négatifs	Total
PG (urines : N= 60)	Cobas Amplicor	0	0	0	60	60
	m2000	0	0	0	60	60
PG (écouvillon s : N=13)	Cobas Amplicor	0	0	0	13	13
	m2000	0	0	0	13	13
TS (écouvillon s : N=48)	Cobas Amplicor	0	2	1	45	48
	m2000	0	2	1	45	48
MSM (urines : N=60)	Cobas Amplicor	10	8	4	38	60
	m2000	9	7	4	40	60

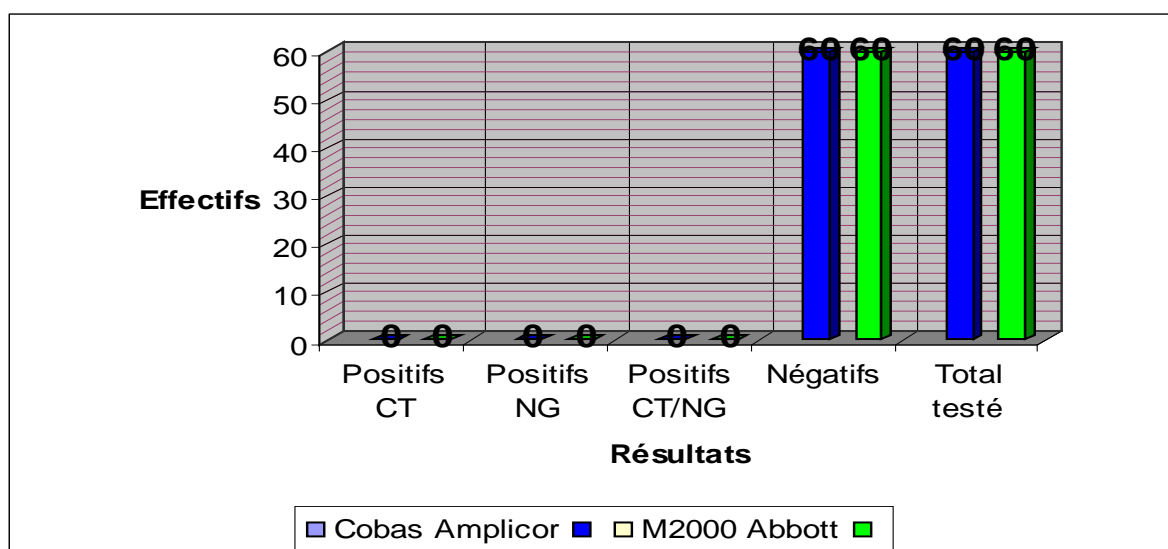


Figure 20 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements d'urines de la population générale.

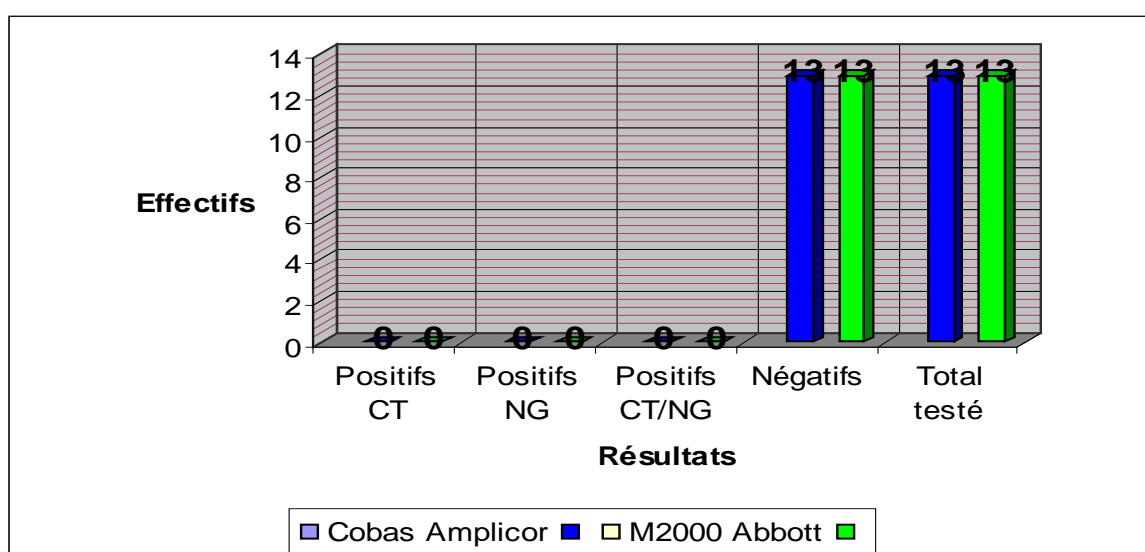


Figure 21 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements par écouvillonnage endocervical de la population générale.

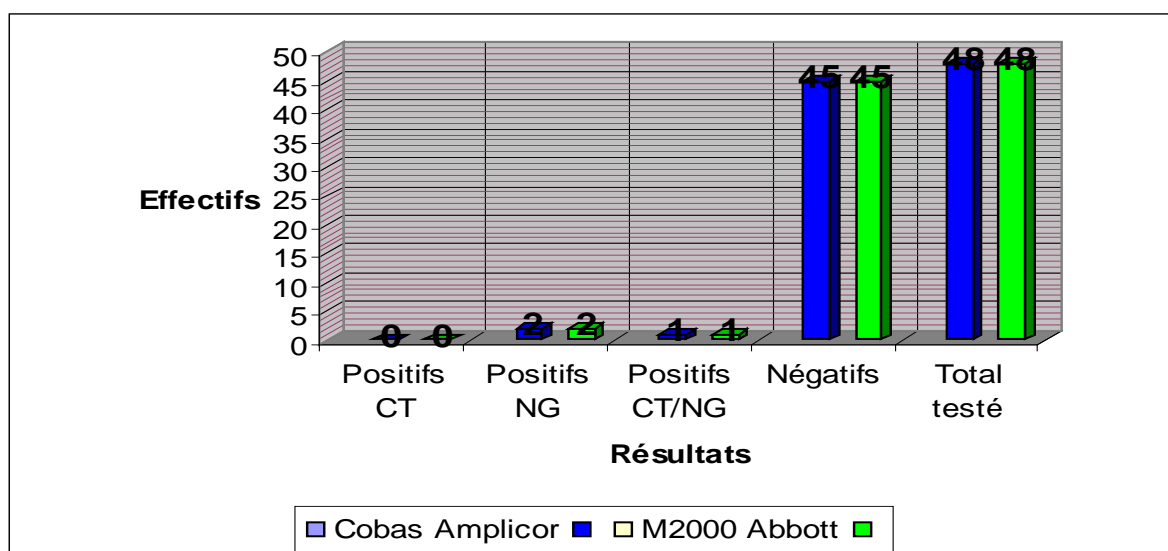


Figure 22 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements par écouvillonnage endocervical des travailleuses du sexe.

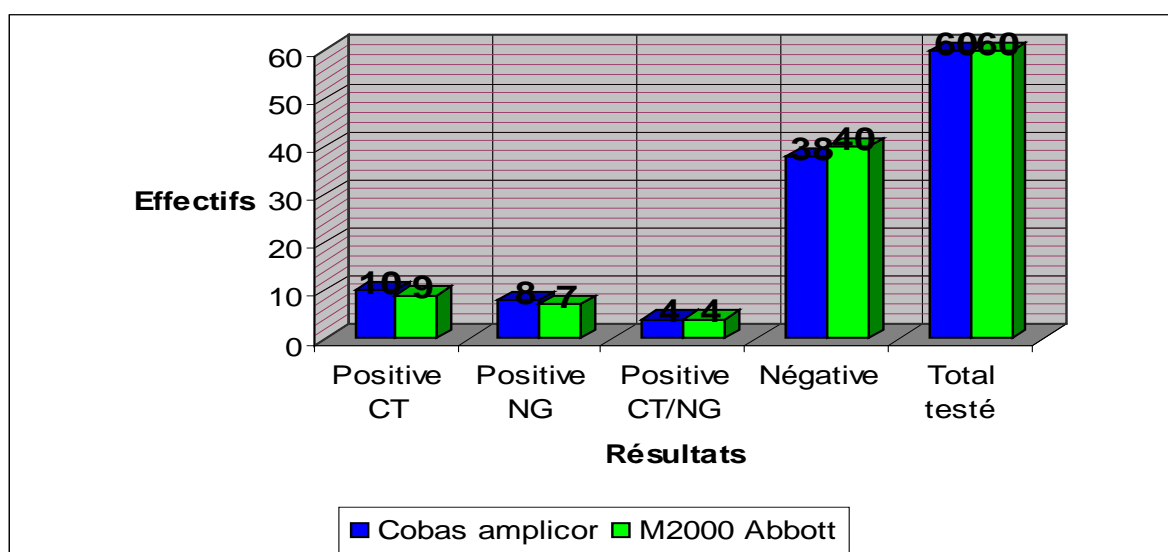


Figure 23 : Résultats comparés Cobas Amplicor/m2000 sur les prélèvements d'urines des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes.

#### IV. 1. 2. 2. Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection des CT/NG.

Sur les 120 échantillons d'urines testés, 22 sont positifs avec le Cobas dont 20 étaient positifs avec m2000 Abbott (tableau 11 et figure 24).

Concernant les échantillons d'écouvillons, les deux techniques sont concordantes pour 3 échantillons sur 61 échantillons testés (tableau 11 et figure 24).

Tableau 11 : Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*.

Comparaison Cobas/m2000		Urines : N = 120	Ecouvillons : N = 61
Cobas Amplicor	Positifs	22	3
	Négatifs	98	58
m2000 Abbott	Positifs	20	3
	Négatifs	100	58

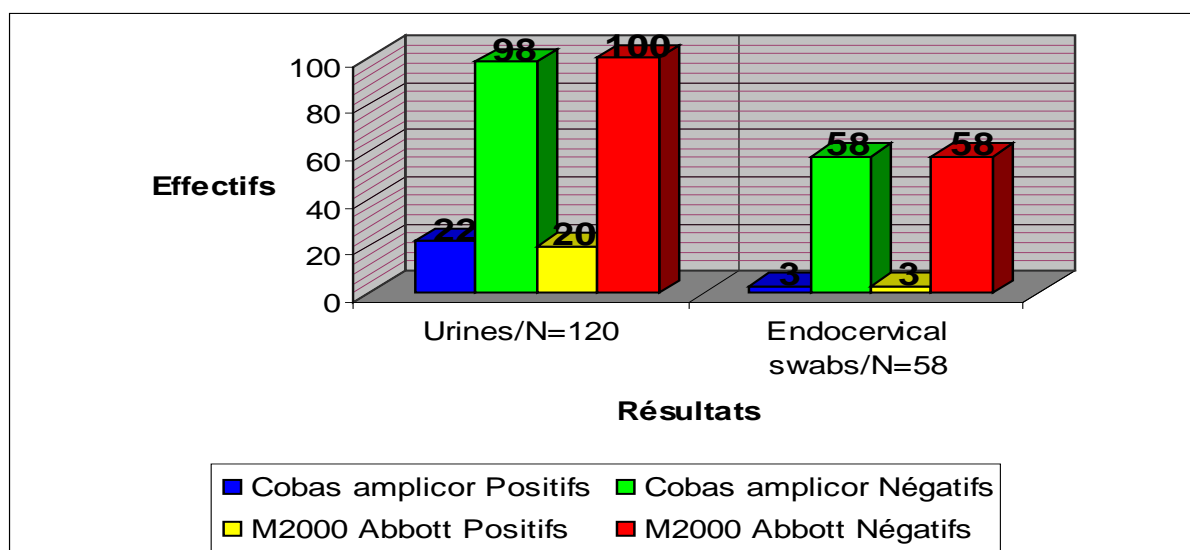


Figure 24 : Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*.

#### IV. 1. 2. 3. Evaluation comparée sur les deux techniques

Nous avons fait une évaluation comparée des deux techniques sur la taille de la série, le volume consommé pour un échantillon, les interventions manuelles, le temps nécessaire aux interventions manuelles et aux appareils, les températures de conservation des réactifs et le coût des tests. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 12 et 13

Tableau 12 : Evaluation comparée des deux techniques.

Technique	Série	Taille série	Volume consommé/échantillon	Temps mis par l'appareil		
				Extraction ADN	Amplification	Amplification Et/ou détection
Cobas Amplicor	2	44 (4)	50 $\mu$ l	////	4h 44min	4h 50min
m2000	1	45 (3)	1,4ml	2h 37 min	////	2h 01min

(...) = contrôle

Tableau 13 : Suite sur l'évaluation comparée des deux techniques.

Technique	Nombre Etapes manuelles	Temps interventions manuelles (mn)	Conservation des réactifs	Coût test/série	Coût test/prélèvement
Cobas Amplicor	07 × 2	280	Entre 2 et 8°C	208944 FCFA × 2	8706 FCFA
m2000	03	63	-20°C	634285,625 FCFA	13214,2839 <sub>FCFA</sub>

#### IV. 1. 3. Analyse statistique et calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives négative et positive.

Les résultats obtenus pour *C. trachomatis* concernant les prélèvements d'urines des MSM sont consignés dans les tableaux de contingence 14 et le calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative dans le tableau 15.

Tableau 14: Tableau de contingence de *C. trachomatis* sur les échantillons d'urines des MSM.

Comparaison CT urines MSM		Cobas Amplicor		
		Positif	Négatif	Sous totaux
m2000Abbott	Positif	13	0	13
	Négatif	1	46	47
	Sous totaux	14	46	60

Sur un total de 60 échantillons testés, les deux techniques concordent sur les 59.

Tableau 15 : Calcul des valeurs de la sensibilité (Se), de la spécificité (Sp) et des valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN).

<u>Cobas Amplicor</u>	<u>m2000.Abbott</u>
Sensibilité (Se) $Se = (VP / (VP+FN)) \times 100$ $Se = (13/13) \times 100 = 100\%$	Sensibilité (Se) $Se = (VP / (VP+FN)) \times 100$ $Se = (13/ (13+1)) \times 100 = 93\%$
Spécificité (Sp) $Sp = (VN / (FP+VN)) \times 100$ $Sp = (46 / (1+ 46)) \times 100 = 98\%$	Spécificité (Sp) $Sp = (VN / (FP+VN)) \times 100$ $Sp = (46/46) \times 100 = 100\%$
Valeur prédictive positive (VPP) $VPP = (VP / (VP+FP)) \times 100$ $VPP = (13 / (13+1)) \times 100 = 93\%$	Valeur prédictive positive (VPP). $VPP = (VP / (VP+FP)) \times 100$ $VPP = (13/13) \times 100 = 100\%$
Valeur prédictive négative (VPN). $VPN = (VN / (FN+VN)) \times 100$ $VPN = (46 / (46 \times 100)) = 100\%$	Valeur prédictive négative (VPN) $VPN = (VN / (FN+VN)) \times 100$ $VPN = (46 / (46+1)) \times 100 = 98\%$

Nous avons utilisé le test statistique kappa pour étudier les résultats des deux techniques dans la détection de *C. trachomatis*.

Calcul du coefficient Kappa (K).

➤ Hypothèses

Hypothèse nulle :  $H_0$  : il n'y a pas d'accord entre les deux techniques.

Versus :  $H_1$  : il y a un accord inter technique.

➤ Calcul de k

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

$$P_o = \sum_{i=1}^r P_{ii} = (1/n) \sum_{i=1}^r n_{ii} = (1/60) \times (13 + 46) = 0,98$$

$$P_e = \sum_{i=1}^r P_{i.} \cdot P_{.i} = (1/n^2) \sum_{i=1}^r n_{i.} \cdot n_{.i} = 1/60^2 (13 \times 14 + 47 \times 46) = 0,65$$

$$K = (0,98 - 0,65) / (1 - 0,65) = 0,94$$

➤ Conclusion :  $K > 0 \implies$  On rejette  $H_0$ , il y a un accord entre les deux techniques.

➤ Appréciation :  $K > 0,81 \implies$  K est excellent.

Les résultats obtenus pour *N. gonorrhoeae* concernant les échantillons d'urines des MSM sont consignés dans le tableau de contingence 16 et le calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative dans le tableau 17.

Tableau 16 : Tableau de contingence de *N. gonorrhoeae* sur les échantillons d'urines des MSM.

Comparaison NG urines MSM		Cobas Amplicor		Sous totaux
		Positif	Négatif	
Abbott m2000	Positif	11	0	11
	Négatif	1	48	49
	Sous totaux	12	48	60

Sur un total de 60 échantillons testés, les deux techniques concordent sur les 59.

Tableau 17 : Calcul des valeurs de la sensibilité (Se), de la spécificité (Sp) et des valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN).

<u>Cobas Amplicor</u>	<u>m2000Abbott</u>
Sensibilité (Se) $Se = (VP / (VP+FN)) \times 100$ $Se = (11 / 11) \times 100 = 100\%$	Sensibilité (Se) $Se = (VP / (VP+FN)) \times 100$ $Se = (11 / (11+1)) \times 100 = 92\%$
Spécificité (Sp) $Sp = (VN / (FP+VN)) \times 100$ $Sp = (48 / (1+ 48)) \times 100 = 98\%$	Spécificité (Sp) $Sp = (VN / (FP+VN)) \times 100$ $Sp = (48/48) \times 100 = 100\%$
Valeur prédictive positive (VPP). $VPP = (VP / (VP+FP)) \times 100$ $VPP = (11 / (11+1)) \times 100 = 92\%$	Valeur prédictive positive (VPP). $VPP = (VP / (VP+FP)) \times 100$ $VPP = (11/11) \times 100 = 100\%$
Valeur prédictive négative (VPN). $VPN = (VN / (FN+VN)) \times 100$ $VPN = (48 / (48 \times 100)) = 100\%$	Valeur prédictive négative (VPN) $VPN = (VN / (FN+VN)) \times 100$ $VPN = (48 / (48+1)) \times 100 = 98\%$

L'étude des résultats a également été faite avec le test kappa.

Calcul du coefficient Kappa (K)

➤ Hypothèses

Hypothèse nulle : H0 : il n y a pas accord entre les deux techniques.

Versus : H1 : il y a un accord intertechnique.

➤ Calcul de k

$$K = Po - Pe / 1 - Pe$$

$$Po = \sum_{i=1}^r P_{ii} = (1/n) \sum_{i=1}^r n_{ii} = (1/60) \times (11+48) = 0.98$$

$$Pe = \sum_{i=1}^r P_{i.} P_{.i} = (1/n^2) \sum_{i=1}^r n_{i.} n_{.i} = 1/60^2 (11 \times 12 + 49 \times 48) = 0,69$$

$$K = (0,98 - 0,69) / (1 - 0,69) = 0,94$$

➤ Conclusion :  $K > 0 \implies$  On rejette Ho, il y a un accord entre les deux techniques

➤ Appréciation :  $K > 0,81 \implies$  K est excellent.



Les résultats obtenus pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* concernant les échantillons obtenus par écouvillonnage endocervical sont consignés dans les tableaux de contingence 18 et 19.

Tableau 18 : Tableau de contingence de *C. trachomatis* sur les écouvillons des TS.

Comparaison écouvillons TS		Cobas Amplicor		Sous totaux
		Positif	Négatif	
Abbott m2000	Positif	1	0	1
	Négatif	0	47	47
	Sous totaux	1	47	48

Les deux techniques concordent parfaitement sur les 48 échantillons testés. Ce qui conduit à l'absence de faux résultats. Par conséquent tous la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative sont maximales pour les deux techniques.

Sensibilité (Se) = 100%.

Spécificité (Sp) = 100%.

Valeur prédictive positive (VPP) = 100%.

Valeur prédictive négative (VPN) = 100%.

Tableau 19 : Tableau de contingence de *N. gonorrhoeae* sur les écouvillons des TS.

Comparaison écouvillons TS		Cobas Amplicor		Sous totaux
		Positif	Négatif	
Abbott m2000	Positif	3	0	3
	Négatif	0	45	45
	Sous totaux	3	45	48

Sur les 48 échantillons testés, les deux techniques sont parfaitement concordantes.

La sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative sont maximales pour toutes les deux techniques.

Sensibilité (Se) = 100%.

Spécificité (Sp) = 100%.

Valeur prédictive positive (VPP) = 100%.

Valeur prédictive négative (VPN) = 100%.

Sur les 60 échantillons d'urines et 13 échantillons d'écouvillons endocervicaux de la population générale, les deux techniques étaient parfaitement concordantes. La sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative sont maximales aussi bien pour la détection de *C. trachomatis* que pour celle de *N. gonorrhoeae* sur ces échantillons.

#### IV. 1. 3. 1. Calcul des valeurs moyennes de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative

##### ➤ Cobas Amplicor

$Se \text{ moyenne (Sem)} = 1/n \sum Sei$   
 $Sem_c = (100+100+100+100+100+100+100+100) / 8 = 100\%$   
 $Sp \text{ moyenne (Spm)} = 1/n \sum Spi$   
 $Spm_c = (98+98+100+100+100+100+100+100) / 8 = 99\%$   
 $VPP \text{ moyenne (VPPm)} = 1/n \sum VPPi$   
 $VPPm_c = (93+92+100+100+100+100+100+100) / 8 = 98\%$   
 $VPN \text{ moyenne (VPNm)} = 1/n \sum VPNi$   
 $VPNm_c = (100+100+100+100+100+100+100+100) / 8 = 100\%$   
 (c = Cobas Amplicor).

##### ➤ m2000 Abbott

$Se \text{ moyenne (Sem)} = 1/n \sum Sei$   
 $Sem_M = (93+92+100+100+100+100+100+100) / 8 = 98\%$   
 $Sp \text{ moyenne (Spm)} = 1/n \sum Spi$   
 $Sp_M = (100+100+100+100+100+100+100+100) / 8 = 100\%$   
 $VPP \text{ moyenne (VPPm)} = 1/n \sum VPPi$   
 $VPPm_M = (100+100+100+100+100+100+100+100) / 8 = 100\%$   
 $VPN \text{ moyenne (VPNm)} = 1/n \sum VPNi$   
 $VPNm_M = (98+98+100+100+100+100+100+100) / 8 = 99\%$   
 (M = M2000Abbott.)

#### IV. 1. 3. 2. Résumé des calculs

Le tableau 20 résume le calcul des valeurs moyennes de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative.

Tableau 20 : Résumé des valeurs moyennes de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative.

	Cobas Amplicor	m2000 Abbott
Sensibilité moyenne Sem	100%	98%
Spécificité moyenne Spm	99%	100%
Valeur prédictive positive moyenne	98%	100%
Valeur prédictive négative moyenne	100%	99%

## IV. 2. Discussion

L'objectif de ce travail était :

- D'une part, d'évaluer les performances de diagnostic des infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* de l'automate m2000Abbott real time sur des prélèvements d'urines et des prélèvements par écouvillonnage endocervical.
- D'autre part, de comparer ces performances à celles du Cobas Amplicor des laboratoires Roche.

Pour cela, les populations d'études ont été ciblées selon le degré de leur exposition à un risque d'être infectées par les IST. C'est pourquoi les travailleuses du sexe (TS) et les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (MSM) ont été choisis. Les MSM font partie de l'enquête MSM 2007 où il y avait 22 positifs avec le Cobas Amplicor. Ce sont ces 22 positifs qui ont été considérés et complétés à 60 échantillons avec d'autres échantillons négatifs avec le Cobas Amplicor. La population générale a été ciblée comme groupe témoin. C'est une population à moindre risque mais néanmoins concernée.

### Comparaison de résultats sur les populations cibles.

Il n'y a eu de résultats positifs que chez les TS et les MSM (aucun résultat positif n'a été enregistré chez les patients provenant de la population générale). Ceci s'expliquerait par les faits suivants :

- La taille de l'échantillon trop faible (60 patients) pour la population générale pour laquelle la prévalence serait très basse.
- Une incidence et une prévalence des IST élevées chez les TS et les MSM.

En effet, le multipartenariat est un phénomène assez répandu chez les TS et les MSM. Et les relations avec partenaires réguliers et partenaires non payants constituent une situation favorable à l'infection par *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* car ces relations :

- ✓ N'induisent pas toujours la fidélité du partenaire.
- ✓ Ne permettent que très difficilement la négociation pour l'usage du préservatif. En effet une relation qui s'inscrit dans le temps induit une impression de familiarité entre partenaires qui rend plus difficile l'utilisation du préservatif.
- ✓ Entraînent, en fin, une sous-évaluation du risque.

- Une vulnérabilité des adolescents des TS et des MSM due à l'immaturité du vagin et du col utérin et de leur capacité moindre à négocier des relations sexuelles protégées et d'un risque accru de violence et d'abus.
- Il faut également noter l'existence de certaines pratiques sexuelles telles que les rapports sexuels oraux et anaux dans ces groupes. Le risque de ces rapports est majeur dans la transmission des IST comme les gonococcies.

### **Comparaison des deux techniques**

#### **➤ Du point de vue performance**

Dans la détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, les résultats du test m2000 sont parfaitement concordants à ceux du Cobas Amplicor à l'exception d'une petite discordance observée sur les échantillons d'urines des MSM. Mais selon le test statistique kappa, les deux techniques sont plutôt concordantes sur ces échantillons d'urines des MSM et les coefficients kappa calculés sont excellents ( $k = 0,94$  pour toutes les deux espèces). Luijt et Shirm (2007), ont montré, par deux fois sur des échantillons d'urines et d'écouvillons urétraux et pharyngeal des discordances et concordances entre ces deux techniques avec leurs premiers résultats. Cependant après des tests de confirmation, ils ont finalement trouvé une concordance montrant que les résultats du Cobas Amplicor qui étaient discordants sont de faux positifs ou de faux négatifs.

Person (2007), a montré une concordance entre les deux techniques avec ses résultats définitifs. Au préalable, il avait trouvé des discordances liées à 13 échantillons faux-positifs avec le Cobas Amplicor et un faux-positif avec le m2000.

Le taux d'inhibition est moindre avec le m2000 comparé au Cobas Amplicor avec lequel les résultats sont fréquemment inhibés. En effet, les prélèvements par écouvillonnage endocervical chez la population générale ont été testés trois fois avec le Cobas Amplicor alors qu'avec le m2000, il y a eu un seul test pour avoir des résultats effectifs. Pour les prélèvements par écouvillonnage endocervical chez les TS, il y a eu plusieurs résultats inhibés avec le Cobas Amplicor avec 25% (12) des résultats seulement effectifs après les premiers tests, 43% (21) après les deuxième tests et les 15 restants à la suite d'un troisième test. Contrairement au m2000, il y a eu 83% (40) de résultats effectifs après les premiers tests sur les prélèvements par écouvillonnage endocervical obtenue chez les TS et l'inhibition a été levée aux deuxième tests.

Ces résultats comme ceux de Luijt et Schirm (2007) et ceux de Person (2007) montrent que le m2000 serait plus sensible que le Cobas Amplicor dans la mesure où les résultats sont effectifs dès les premiers tests avec cette technique. Meller *et al.* (2008), en comparant les deux techniques dans la détection d'une mutation sur le plasmide cryptique de *C. trachomatis* ont montré que le m2000 est plus sensible que le Cobas Amplicor.

Les résultats sont cependant effectifs dès les premiers tests avec les deux techniques pour les prélèvements urinaires. L'inhibition a été notée uniquement sur les échantillons par écouvillonnage endocervical. Cette situation s'expliquerait par la présence de substances qui sont présentes dans les échantillons des patients comme la  $\beta$ HCG ( $\beta$ -Human Chorionic gonadotropin), les cristaux, l'hémoglobine et les nitrites (Whiley *et al.*, 2006). Cela serait à l'origine de l'inhibition des résultats du Cobas Amplicor pour lequel le protocole ne prévoit des lavages après capture des cibles avec particules magnétiques que pendant la détection. Ce qui pourrait être insuffisant pour éliminer de tels éléments. En revanche la décontamination par lavages après capture des cibles avec des particules magnétiques commençant et se poursuivant depuis l'extraction jusqu'à la détection qui se fait en temps réel, ces éléments seraient éliminés dans le cas du m2000. Pour les quelques échantillons inhibés avec le m2000, une homogénéisation correcte des réactifs permet de lever l'inhibition. Celle-ci serait liée à une mauvaise homogénéisation des réactifs congelés.

La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative sont respectivement 100%, 99%, 98%, et 100% pour le Cobas Amplicor et 98%, 100%, 100%, et 99% pour le m2000. Person (2007) a trouvé pour la sensibilité et la spécificité respectivement 99,4% et 100% pour le Cobas Amplicor et 100% et 100% pour le m2000. Meller *et al.* (2008), ont trouvé comme sensibilité et spécificité respectivement 68,7% et 99% pour le m2000 et 63,8% et 99% pour le Cobas Amplicor.

Ces résultats, sauf les sensibilités trouvées par Meller *et al.* (2008), ne montrent pas de grandes différences entre les deux techniques.

#### ➤ **Sur le plan technique.**

Le m2000 utilise un volume supérieur à celui du Cobas Amplicor pour un échantillon donné. Il est également plus exigeant quant à la conservation de ses réactifs qui se fait à -20°C alors que pour le Cobas Amplicor les réactifs sont conservés entre +2°C et +8°C

Cependant le système m2000 nécessite, pour le test d'une série de 45 échantillons et 3 contrôles, un temps moindre comparé à celui nécessaire par le Cobas Amplicor pour une série

de 22 échantillons et 2 contrôles. Avec ce système il faut un temps total de 4h 40mn pour une série de 45 échantillons et 3 contrôles alors que pour le Cobas Amplicor il faut au total 9h 34mn pour 2 séries de 22 échantillons et 2 contrôles chacune. Luijt et Schirm (2007), ont trouvé pour une série de 45 échantillons et 3 contrôles avec le m2000, un temps total de 4h 40mn et 9h avec le Cobas Amplicor pour 2 séries de 22 échantillons et 2 contrôles chacune. Lenderman *et al.* (2007), comparant le temps nécessaire dans plusieurs techniques dont le m2000 et le Cobas Amplicor ont trouvé 4h 30 mn pour le m2000 et 7h pour le Cobas Amplicor. Leurs résultats diffèrent des nôtres vu la taille de la série qui est plus petite (32 échantillons).

Le test m2000 Abbott demande très peu d'étapes manuelles par rapport au Cobas Amplicor. Il y a 3 étapes seulement contre 7 pour une série. Ces interventions manuelles se limitent à la maintenance, au transfert des échantillons et réactifs et en fin à sceller la plaque optique pour la transférer au m2000rt. Ainsi certaines étapes manuelles critiques comme la préparation du mélange réactionnel et les manipulations de l'ADN extrait sont évitées avec le m2000.

En conséquence de cette réduction des étapes manuelles, le temps nécessaire pour les interventions manuelles avec le m2000 est nettement inférieur à celui correspondant au Cobas Amplicor. Nous avons trouvé 63 mn pour les interventions manuelles avec le m2000 pour une série de 45 échantillons et 3 contrôles alors qu'avec le Cobas Amplicor il y a eu 280 mn pour deux séries de 22 échantillons et 2 contrôles.

Luijt et Schirm (2007), ont trouvé 1h 15 mn soit 75 mn pour une série de 45 échantillons et 3 contrôles avec le m2000 et 2h 40 mn soit 160 mn pour une série de 22 échantillons et 2 contrôles et donc 320 mn pour deux séries de 22 échantillons et 2 contrôles chacune avec le Cobas Amplicor.

Lenderman *et al.* (2007), ont trouvé 36 mn pour le m2000 et 197mn pour le Cobas Amplicor pour une série de 32 échantillons.

Tous ces résultats montrent que le temps nécessaire pour les interventions manuelles est très variable. Ce qui s'explique par le fait qu'il dépend de la maîtrise des pratiques de laboratoire par le manipulateur.

Il est important pour les laboratoires de considérer la taille de la série et le temps perdu lors des interventions manuelles dans la sélection des techniques d'amplification des acides nucléiques pour la détection des CT/NG.

➤ **Du point de vu économique.**

Sur le plan économique, les tests de diagnostic moléculaire des CT/NG avec les deux techniques sont très chers. Le test m2000 étant le plus cher. En effet, une série de 45 échantillons et 3 contrôles avec le m2000 coûte 634285,625FCFA soit 13214,2839FCFA pour un échantillon. Et pour le Cobas Amplicor une série de 22 échantillons et 2 contrôles coûte 208944FCFA soit 417888FCFA pour les deux séries et 8706FCFA pour un échantillon.

Une série de 48 tests avec le m2000 coûterait 216397,625FCFA de plus qu'avec le Cobas Amplicor à un laboratoire.

Le test m2000 Abbott coûterait 4508,2839FCFA de plus qu'avec le Cobas Amplicor à un patient.

Cependant le m2000 présente un taux d'inhibition des résultats très bas comparé à celui du Cobas Amplicor pour lequel les résultats étaient souvent inhibés avec les écouvillons endocervicaux. Cette situation lui fait perdre son avantage économique sur le m2000. En effet, pour traiter l'ensemble de nos échantillons jusqu'à avoir des résultats définitifs, il a fallu 5 séances avec le m2000 soit un coût global de 3171482,125FCFA alors qu'avec le Cobas Amplicor, les 17 séances de test ont globalement coûté 3552048FCFA.

Plusieurs techniques d'amplification des acides nucléiques pour le diagnostic des infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* sont actuellement disponibles. Ces tests ont une grande sensibilité et une grande spécificité comparés aux cultures et autres méthodes. Les différences entre ces techniques varient considérablement et peuvent affecter les travaux des laboratoires au même titre que les coûts des tests. Il s'avère indispensable de comparer ces techniques pour optimiser leur introduction dans les laboratoires. C'est dans cette optique que nous avons évalué les performances de diagnostic moléculaires des infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* du système m2000 en comparaison avec celles du Cobas Amplicor. Pour cela nous avons utilisé des prélèvements d'urines et des prélèvements par écouvillonnage endocervical que nous avons traités avec les deux techniques.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

- Les performances de diagnostic du m2000 sont similaires à celles du Cobas Amplicor. En effet, la spécificité, la sensibilité et les valeurs prédictives positive et négative trouvées avec le m2000 sont similaires à celles obtenues avec le Cobas Amplicor. Les concordances trouvées entre les deux techniques sont excellentes ( $k = 0,94$  pour la détection des deux espèces).
- Le test m2000 Abbott real time CT/NG est spécifique et sensible avec un taux d'inhibition très bas.
- L'automatisation entière qui permet la réduction des étapes manuelles et du temps nécessaire pour les interventions manuelles, et le taux d'inhibition très bas font du système m2000, une technique très adéquate dans le diagnostic de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae*. Cette technique est plus particulièrement plus efficace pour les laboratoires de diagnostic de routine de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria. gonorrhoeae*.
- Le système m2000 semble être plus sensible que le Cobas Amplicor dans la mesure où il y a plus d'échantillons dont les résultats sont effectifs dès les premiers tests. Toutefois, ce système s'est montré plus adéquat que le Cobas Amplicor dans le traitement des échantillons d'écouvillons endocervicaux. Cependant, il faut noter le coût élevé des ses réactifs même comparé avec ceux du Cobas Amplicor. Cette dernière technique présente souvent une inhibition de ces résultats avec les



échantillons d'écouvillons endocervicaux. Ceci conduit à une répétition des tests donc des pertes de réactifs et par conséquent des pertes économiques et de temps.

Tous ces résultats suggèrent sans doute une certaine réorganisation stratégique dans les laboratoires de diagnostic moléculaire des infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*. Dans cette perspective, nous voulons faire 3 recommandations principales.

Les résultats de notre étude devraient conduire à :

- L'utilisation du système m2000 Abbott pour le diagnostic des infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* aussi bien sur des prélèvements d'urines que sur des prélèvements par écouvillonnage endocervical.
- La recherche d'un système de réduction du coût des réactifs du système m2000 Abbott pour mieux faciliter son introduction dans les pays à ressources limitées.
- L'utilisation du Cobas Amplicor pour le diagnostic des infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* uniquement sur des prélèvements d'urines.

Les prélèvements d'urines pourraient constituer une alternative dans le prélèvement pour le diagnostic de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* car étant moins contraignants et ne rencontrant pas pour certaines populations spéciales des restrictions religieuses ou culturelles.

Cependant, puisqu'il existe plusieurs types de prélèvements (urinaires, écouvillonnage endocervical, écouvillonnage urétral, écouvillonnage pharyngeal et anal, etc.), il s'avère important de déterminer le ou les type (s) de prélèvement (s) le ou les plus approprié (s) dans le diagnostic de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria Gonorrhoeae* avec chacune des deux techniques.

En outre la cause de l'inhibition des tests avec les échantillons par écouvillonnage endocervical surtout avec le Cobas Amplicor doit être étudiée.

- Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F. et Monteil, H.** 2000. Bactériologie clinique. Ellipses Edition Makerting S.A.
- Barnes, R. C. et Hpimes, K. K.** 1984. Epidemiology of gonorrhoeae current perspective. *Epidemiol Re.* **6**: 1-30.
- Batteiger, B. E.** 1996. The major outer membran protein of a single *C. trachomatis* serovar can possess more than one serovar specific epitope. *Infect. Immune* **64**: 2839-2841.
- Black, C. M. et Morse, S. A.** 2000. The use of molecular techniques for the diagnosis and epidemiologic study of sexually transmitted infections. *Curr Infect Dis Rep* **2**. (1) : 31-43.
- Cabral, T., Jolly, A. M. and Wylie, J. L.** 2003. *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypic diversity and concordance with sexual network data. *J. Infect. Dis.* **187** : 279-286.
- Cissé, C.** 2002. Détermination de la prévalence des infections à *C. trachomatis* et *N.gonorrhoeae* en zone rurale (Niakhar) par la technique Amplicor. Dakar: Thèse de pharmacie. 104.
- Coulaud, J. P., Catalan F. et Bohbot, J. M.** 1993. Urétrites gonococciques. Editions Techniques Encycl. Med. Chir. Paris-France, Thérapeutique, 25-367-A-10,
- De Barbeyrac, B., Dupon, M. et Bebear, C.** 1997. Infection à Chlamydia : Maladies infectieuses, 8-037-A-10, Dermatologie, 12-670-B-20, 15p. Encycl Med Chir (Ed Elsevier, Paris)
- Delaveyne, R., Xerri, B., Vtry, A., Preaubort, N. et Rumeau-Pichon, C.** 2003. Place des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des infections uro-génitales basses à *Chlamydia trachomatis*, **1** : 1-7
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. et Bollet, C.** 2000. Précis de Bactériologie clinique, Editions ESKA. 408-415.
- Geisler, W. M., Suchland, R. J., Whittington, W. L. and Stamm, W. E.** 2003. The relationship of serovar to clinical manifestation of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex. Transm. Infect.* **30**: 160-165
- Hans, F., Lars, F., Margaretha, J. et Magnus, U.** 2004. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions, *APMIS* vol **112**, issue 11-12 pages 771-784.
- Hayes, R. J., Schulz, K. F. et Plummer F. A.** 1995. The cofactor effect of genital ulcers in the per exposure risk of HIV transmission in sub-Saharan Africa. *Journal of tropical Medicine and hygiene.* **98**: 1-8.
- Hsieh, Y. H., Bob, L. D., Quinn, T. C. et West, S. K.** 2000. Risk factors for trachoma: 6 years follow up of children aged 1 and 2 years. *Am. J. Epidemiol.* Vol **152**. n 3: 204-205.

- Kenneth, P.** 2007. Clinical Comparison of the m2000 System (Abbott) and the Cobas Amplicor (Roche) for the diagnosis of CT in Urine samples, Dept, Clinical Microbiology, Malmo, University Hospital, SE-205 02 Malmo, Sweden
- Lalou, R., Diop, I. L. et Faye C. M.** 2007. Rapport Enquête Nationale de Surveillance Combinée des IST et du VIH/SIDA (ENSC). 2006. Dakar. 89.
- Lenderman, C. J., Dixon, P. B. et Ewhook III.** 2007. Time-Motion Comparison of the IU Abbott real time CT/NG Assay, Gen-prob Aptima combo 2 Assay, BD Probetec et System and Cobas Amplicor assays for chlamydial and gonorrhea diagnosis. University of Alabama at Birmingham, Birmingham. AL, USA P-155.
- Luijt, D. S. and Schim, J.** 2007. Evaluation of the Abbott m2000 real time PCR *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Assay in urine samples, and comparison with the Roche Cobas Amplicor *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* PCR tests, laboratory for infectious diseases. Van Ketwich Verschuurtann 92,9721SW Groningen The Netherlands Germany Postersession II.
- Luijt, D. and Schim, J.** 2007. Evaluation of the Abbott m2000sp/rt real time PCR *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* PCR Assay using urogenital and throat swabs in 2-SP transport medium laboratory for infectious diseases Department of virus and nucleic acid detection Van Ketwich Verschuurtann 92,9721SW. Groningen the Netherlands. Germany Postersession P020.
- Mboup, S., Diouf, O. et Gueye-Gaye, A.** 2006. Données épidémiologiques du VIH/SIDA au Sénégal 2000 à 2004. Laboratoire de Bactériologie et de Virologie CHU, A. Le Dantec-Dakar / Sénégal. 72.
- Meller, J. K., Pedersen, L. N. et Person, K.** 2008. Comparison of Gen-Probe TMA, Abbott PCR and Roche PCR for the detection of wild type and mutant plasmid strains of *Chlamydia trachomatis*, *J Clin Microbiol* (Epub ahead of print).
- Morsure, D. J., Berman, S., Kleinbaun, D. et Mallozan, M. E.** 2000. Predictors of *Chlamydia trachomatis* among female adolescents: longitudinal Analysis. *Am. J. Epidemiol.* Vol.151. n 12.
- Nauciel, C.** 2000. Bactériologie médicale. Manson Paris. 275.
- Ndiaye, A.** 1994. Etudes prospectives des infections urogénitales à Mycoplasme et à *Chlamydia trachomatis* à Dakar. Thèse de pharmacie. Dakar.
- Pilet, C., Bourdon, J. I L., Toma, B., Marchal, N. et Balbastre, C.** 1979. Bactériologie médicale et vétérinaire. ISBN2-7040-0362-9 2<sup>e</sup> édition 3<sup>e</sup> tirage by Doin Editeurs.

- Pomabia, N. A.** 2007. Contrôle de qualité externe d'un test de diagnostic moléculaire : Recherche de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* par la technique COBAS AMPLICOR à partir de prélèvement urinaires. Mémoire de Diplôme d'Ingénieur Technologue en Génie Biologie et Sanitaire. Dakar. 67.
- Puollakkainen, M., Heltunen-Back, E., Reunala, T., Suhonen, S., Lahteenmaki, P., Lehtinen, M. et Paavonen, J.** 1998. Comparison of performance of two commercially available tests, a PCR assay as Roche Cobas Amplicor CT/NG test and Ligase Chain reaction test in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *Journal of clinical microbiology*. vol **32**. no6: 1488-1493 (5pages).
- Quin, T. C., Laura, W., Andrew, L., Kimberly, C., Jonathan, Z., M. James, N. and Charlotte, G.** 1996. Diagnostic by Amplicor PCR of *Chlamydia trachomatis* infections in urine samples from women and men attending sexually transmitted disease clinics. *Journal of clinical microbiology*. vol **34**. no 6: 1401-1406.
- Scatcher, J.** 1999. Infection and disease epidemiology.  
*Chlamydia*: intracellular, biology, pathogenesis and immunity. *An. Soc, Microbiol.* 140-143
- Scatcher, J. et Stamm, W. E.** 1999. Chlamydia, Manual of Clinical Microbiology.  
7<sup>th</sup> Ed. 795-806.
- Semeniuk, H., Zentner, A., Read, R. et Church, D.** 2002. Evaluation of sequential testing strategies using non-amplified and amplified methods for the detection of CT in endocervical and urine specimen from women, *Diagnostic microbiology and infectious disease*. vol **42**. no1: 43-51. (9 pages).
- Serre, J. L. et Coll,** 2002. Les Diagnostics génétiques. Dunod Paris. 308.
- Stamm, W. E. et Holmes, K. K.** 1972. Infections à *Chlamydia*, principes de médecine, Ed Médecine-Sciences-Flammarion. : 764-772.
- Sturm-Ramirez, Brumblay, H., Diop, K., Gueye-Ndiaye, A., Sankale, J. L., Thior, I., Ndoeye, I., Hsieh, C. E., Mboup, S. et Kanki, P. J.** 2000. Molecular epidemiology of genital *C. trachomatis* infection in high risk Women in Senegal, West Africa. *J. Clin. Microbiol.* **38**. (1): 138-45.
- Westrom, L. V.** 1996. *Chlamydia* and its effects in reproduction. *J Brit. Fort. Sec.* **1**. (1): 23-30.
- Wexner, S. D.** 1990. Sexually transmitted diseases of colon, rectum and anus. *Dis colon Rectum.* **33**: 1048-1063.
- Whiley, D. M., Tapsall, J. W. and Sloots, T. P.** 2006. Nucleic acid amplification testing *N. gonorrhoeae*, an ongoing challenge. *J Mol Diagn.* **8**. (1) : 3-15.

**Winter, P. C., Hickey, G. I. et Fletcher, H. L.** 2000. L'Essentiel en génétique, Bios scientific publishers limited. 1999 Oxford, Port Royal Livres paris. 398.