

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

MISE AU POINT D'UN TEST ELISA POUR DÉTECTER LES ANTICORPS
ANTI-CHLAMYDIA PNEUMONIAE.

Par
Nadia Boufaied
Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

Mai 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-61718-1

REMERCIEMENTS

Je voudrais en premier lieu remercier Dr. Frost de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir aussi bien guidé tout au long de ma maîtrise me permettant ainsi de me découvrir une passion pour la recherche.

Je tiens à remercier particulièrement Sylvie Deslandes pour ses conseils, l'aide technique mais aussi pour la formidable amitié que l'on partage. Je tiens aussi à remercier Normand Laframboise pour m'avoir continuellement encouragé.

Je tiens également à remercier l'équipe du Dr. Bourgaux pour l'aide technique qu'elle m'a apportée.

Je voudrais remercier mon mari Hichem et mon fils Skander pour leur patience, leur soutien et leur amour. Je leur dois le fruit de ce travail

Enfin, je remercie mes parents ainsi que mes soeurs Sonia, Ines et Sophia qui ont toujours cru en moi et qui ont toujours été présents pour m'appuyer

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
RÉSUMÉ.....	XIII
1 INTRODUCTION :.....	1
<i>1.1 Introduction générale sur les Chlamydia :.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Biologie moléculaire de la membrane des Chlamydia (Antigènes de surface) :.....</i>	<i>3</i>
<i>1.3 Corrélation entre C. pneumoniae et l'athérosclérose :.....</i>	<i>7</i>
1.3.1 Données séroépidémiologiques :.....	8
1.3.2 Études des complexes immuns :.....	9
1.3.3 Présence de <i>C. pneumoniae</i> dans les lésions athéromateuses :.....	10
1.3.4 Étude de l'effet des antibiotiques :.....	11
1.3.5 Les modèles expérimentaux :.....	12
1.3.6 Quel est le rôle de <i>C. pneumoniae</i> dans l'athérosclérose ? :.....	15
<i>1.4 Méthodes actuelles du diagnostic de C. pneumoniae :.....</i>	<i>18</i>

1.4.1 Isolement par culture cellulaire :	19
1.4.2 Test sérologique :	20
1.4.3 Détection antigénique :	21
1.4.4 Détection des acides nucléiques par PCR :	22
1.4.5 Utilité d'un test de diagnostic de <i>C. pneumoniae</i> :	23
1.5 <i>Objectif du projet</i> :	23
2 MATÉRIELS ET MÉTHODES :	25
2.1 <i>La réaction d'amplification de l'ADN avec une polymérase (PCR)</i> :	25
2.1.1 Extraction de l'ADN au NaOH :	26
2.1.2 Conditions générales de PCR :	26
2.1.3 Conditions particulières à l'amplification du gène <i>omp1</i> pour le clonage :	27
2.1.4 Conditions particulières à l'amplification de <i>omp2</i> pour le clonage :	28
2.1.5 Détection de <i>C. pneumoniae</i> par PCR :	28
2.1.5.1 Gène de l'ARN ribosomal 16S :	28
2.1.5.2 Le gène <i>omp1</i> :	29
2.1.5.3 Le gène inconnu de Campbell :	30
2.1.6 Électrophorèse sur gel d'agarose :	30
2.2 <i>Clonage dans les vecteurs d'expression</i> :	30
2.2.1 Endonucléases de restriction	31
2.2.2 Préparation des vecteurs et des inserts pour le clonage :	31
2.2.3 Ligation et transformation :	32
2.2.4 Extraction de l'ADN plasmidique et vérification des clonages :	33

2.3	<i>Induction de l'expression des protéines</i> :	33
2.3.1	Conditions d'induction :	33
2.3.2	Extraction de la protéine suite à l'induction :	34
2.3.3	Électrophorèse des protéines en présence de SDS:	34
2.3.4	Transfert électrophorétique sur nitrocellulose (Western blot) :	35
2.3.5	Révélation des protéines par des anticorps spécifiques et détection ECL :	35
2.3.6	Purification des protéines sur colonne :	36
2.4	<i>Test ELISA</i> :	37
2.4.1	Préparation des plaques :	37
2.4.2	Adsorption des sérums :	37
2.5	<i>Extraction de l'ADN du plasma des patients</i> :	38
2.6	<i>Extraction de l'ADN des tissus (biopsies d'artères)</i> :	39
2.6.1	Extraction par billes de verre dans du STM :	39
2.6.2	Extraction au STM et protéinase K :	39
2.6.3	Extraction par billes de verre dans le tampon Moazed et al. :	40
3	RÉSULTATS :	41
3.1	<i>Clonage des antigènes des trois Chlamydia</i> :	41
3.1.1	Clonage du gène codant pour la protéine MOMP de <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> et <i>C. psittaci</i> :	41
3.1.2	Clonage des oligonucléotides CHLAM HS1 et CHLAM HS2 :	42
3.1.3	Clonage du gène codant pour la protéine CrP60 de <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> et <i>C. psittaci</i> :	46

3.2	<i>Production des protéines clonées :</i>	48
3.2.1	Induction des protéines clonées :.....	48
3.2.2	Extraction des protéines clonées :.....	52
3.2.3	Purification sur colonne d'amylose des protéines clonées:.....	62
3.3	<i>Optimisation des paramètres de l'épreuve ELISA</i>	68
3.4	<i>Analyse de sérums humains :</i>	78
3.5	<i>Recherche de C. pneumoniae dans les biopsies de tissu artériels et dans les cellules du sang :</i>	82
4	DISCUSSION :	87
5	BIBLIOGRAPHIE :	98

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma des vecteurs d'expression pMAL modifiés :Insertion d'une partie du site de clonage multiple de pUC19 (fragment EcoR I / Sal I) dans le site de clonage multiple des vecteursPMAL pour augmenter le nombre de sites de restrictions de ces derniers43
- Figure 2 : Clonage du gène *omp1* des trois espèces du genre *Chlamydia* dans les vecteurs pMAL44
- Figure 3 : Clonage de l'oligonucléotide CHLAM HS1 dans le vecteur pUC19 puis son transfert dans les vecteurs pMAL47
- Figure 4 : Clonage du gène de la protéine CrP60 des trois membre du genre *Chlamydia* dans les vecteurs pMAL49
- Figure 5 : Détermination des conditions optimales d'induction de la production de la protéine MOMP de *C. trachomatis*, variationde la température et de la concentration d'IPTG. de la concentration d'ITPG.....50
- Figure 6 : Influence des conditions d'induction sur la solubilité de la protéine MOMP de *C. trachomatis* et sur son extraction.....51
- Figure 7 : Comparaison entre l'efficacité d'induction des clones pMAL_{p2} et pMAL_{c2} contenant le gène *omp1* introduits dans les bactéries DH5 α et du clone pMAL_{c2} contenant le gène *omp1* transféré dans les AD49453

- Figure 8 : Extraction selon les recommandations de New England Biolabs de la protéine de *C. trachomatis* exprimée par pMALp₂: profils des protéines présentes dans les différentes fractions obtenues suite à la lyse bactérienne et au choc osmotique.....55
- Figure 9 : Modification du pH du tampon de lyse de New England Biolabset l'effet de ce changement sur la solubilité de la protéine MOMPde *C. trachomatis* exprimée dans pMAL₂.....56
- Figure 10 : Tentative d'extraction par d'autres méthodes que celle de New England Biolabs (si possible non dénaturantes) de la protéine MOMP de *C. trachomatis* exprimée par pMALp₂.....58
- Figure 11 : Extraction de la protéine MOMP de *C. trachomatis* exprimée par pMALc₂ induit dans les bactéries DH5α ou AD494.60
- Figure 12 : Solubilisation par différents agents dénaturants de la protéine MOMP de *C. trachomatis* se trouvant dans la matière insoluble.....61
- Figure 13 : Extraction par l'urée et la guanidine de la protéine CrP60 de *C. pneumoniae* à partir de la matière insoluble.....63
- Figure 14 : Effet du temps et de la température d'incubation d'un agent réducteur (DTT) combiné à l'urée (8M) dans l'extraction de la protéine CrP60 à partie de la matière insoluble64
- Figure 15 : Recherche de composés pour maintenir la solubilité la protéine MOMP de *C. trachomatis* après dialyse.....66
- Figure 16 : Efficacité du PEG et de la glycine à maintenir soluble la protéine MOMP de *C. trachomatis* sans en compromettre la purification sur colonne d'amylose.....67
- Figure 17 : Purification sur colonne de la protéine MOMP de *C. pneumoniae* ainsi que les oligopeptides CHLAM HS1 et CHLAM HS2 exprimés par le vecteur pMALc₂.....69

Figure 18 : Purification sur colonne de la protéine MOMP de <i>C. psittaci</i> exprimée par le vecteur pMALc ₂ dans les bactéries AD494	70
Figure 19 : Comparaison de l'efficacité des méthodes d'extraction employées pour récupérer l'ADN des biopsies d'artères présentant des lésions athérosclérotiques.....	84
Figure 20 : Comparaison de l'efficacité des méthodes d'extraction employées pour récupérer l'ADN des cellules du sang des patients qui ont subi une chirurgie vasculaire.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Échiquier pour déterminer la quantité de protéine à fixer sur la plaque et la dilution du Sérum.....	72
Tableau 2 : Détermination de la concentration de l'anti-IgG humain couplé à la peroxydase à utiliser pour le test ELISA	73
Tableau 3 : Vérification de l'efficacité de notre test ELISA sur une série de sérums de patients dont les prélèvements urogénitaux ont été testés négatifs pour <i>C. trachomatis</i> par PCR.....	75
Tableau 4: Comparaison entre un test ELISA réalisé avec des sérums non adsorbés versus des sérums adsorbés par les extraits de <i>E. coli</i>	77
Tableau 5 : Compilation des résultats sérologiques obtenus par notre test ELISA pour les patients dont le prélèvement urogénital a été testé positifs pour <i>C. trachomatis</i>	80
Tableau 6 : Compilation des résultats sérologiques obtenus par notre test ELISA pour les patients dont le prélèvement urogénital a été testé négatif pour <i>C. trachomatis</i>	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BSA	Albumine de sérum bovin
CE	Corps élémentaire
CI	Complexe immun
CR	Corps réticulé
CrP12	Protéine riche en cystéine de 12 kDa
CrP60	Protéine riche en cystéine de 60kDa
CSF	« Colony stimulating factor »
CTAB	Hexamidécyltriméthyl ammonium bromide
DFA	Immunofluorescence direct
DTT	Dithiothréitol
EIA	Technique immunoenzymatique
ELISA	« Enzyme linked immunoasorbent assay »
GAG	Glucosaminoglucane
HDL	Lipoprotéine de haute densité
hsp60	Protéine de réponse au stress de 60kDa
ICAM-1	« Intracellular adhesion molecule 1 »
ICC	Immunohistochimie
IL1	Interleukine 1

IL6	Interleukine 6
IL8	Interleukine 8
INF γ	Interferon γ
IPTG	Isopropyl β -D- thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LGV	Lymphogranulome vérérien
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	Protéine de liaison au maltose (Maltose binding protein)
MCP-1	« Monocyte chemotactic protein »
MIF	Microimmunofluorescence
MOMP	Protéine majeure de la membrane externe
MTS	Maladie transmise sexuellement
ORF	Cadre de lecture ouvert
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyéthylène glycole.
Pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDI	protéine disulfure isomérase
RNAse	Ribonucléase
RPM	Révolution par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TNF α	« tumor necrosis factor »

trx B	Thioredoxine réductase
UV	Ultraviolet
VCAM-1	« Vascular cell adhesion molecule 1 »

RÉSUMÉ

Lorsque nous avons entrepris de mettre au point un test ELISA basé sur la protéine MOMP pour détecter les anticorps anti-*Chlamydia pneumoniae*, nous espérions entre autre montrer qu'il s'agissait de la protéine immunodominante de cette bactérie mais qu'on a pas pu l'identifier puisqu'il fallait la dénaturer pour l'isoler. Nous voulions aussi se doter d'un test de diagnostic efficace pour retracer les anticorps anti-*C. pneumoniae* et ainsi être capable d'identifier un facteur de risque de l'athérosclérose quand l'implication de *C. pneumoniae* dans le développement de cette maladie serait reconnue officiellement.

L'identité de la protéine immunodominante de *C. pneumoniae* va demeurer encore mystérieuse car même si on a été capable d'exprimer la protéine MOMP dans *E. coli* grâce aux vecteurs pMAL, il nous a été impossible de la produire dans sa conformation native. Cet échec en a entraîné un autre c'est-à-dire la production d'un test ELISA sensible et efficace pour détecter les anticorps produits suite à une infection à *C. pneumoniae* et par conséquent de faire une corrélation entre leur présence dans l'organisme et le développement de l'athérosclérose. Cependant on a montré qu'un test ELISA est envisageable à condition d'avoir la protéine MOMP native ou une toute autre protéine de *C. pneumoniae* facile à produire ou insensible à la dénaturation, puisqu'on a mis au point un test efficace pour détecter les anticorps dirigés contre la protéine MOMP de *C. trachomatis*.

1 INTRODUCTION :

1.1 Introduction générale sur les *Chlamydia* :

Les *Chlamydia* sont de petites bactéries parasites intracellulaires obligatoires puisqu'elles sont incapables de synthétiser l'ATP ou le GTP (McClarty et al., 1994). Elles ressemblent donc énormément aux virus à ce niveau-là. Cependant, elles possèdent une paroi cellulaire composée d'une membrane interne et externe similaire à celle des bactéries Gram négatives. Elles se répliquent par fission binaire, contiennent de l'ADN, de l'ARN et des ribosomes. Elles sont également capables de synthétiser certaines protéines (Cook et Honeybourne, 1994).

La multiplication des *Chlamydia* s'effectue selon un cycle biphasique unique chez les procaryotes. La bactérie existe sous deux formes de vie distinctes, chacune adaptée à un environnement spécifique. La première forme est le corps élémentaire (CE) qui ressemble à une spore. Il est infectieux mais métaboliquement inerte et possède une paroi rigide qui le protège des agressions possibles de l'environnement. Le corps élémentaire se fixe sur une cellule hôte par un mécanisme de type adhésion-récepteur. Des études récentes suggèrent que les *Chlamydia* emploient le mimétisme moléculaire pour le sulfate d'heparan afin de s'attacher aux récepteurs glycosaminoglucanes (GAG) de la surface des cellules eucaryotes (Stephens, 1994). La protéine principale de la membrane externe (MOMP) semble jouer un rôle dans ce processus en réduisant

la répulsion électrostatique entre la cellule hôte et le corps élémentaire (Su et al., 1990). Une fois adsorbé, le corps élémentaire accède à l'environnement intracellulaire sans pour autant pénétrer dans le cytoplasme. Il reste et se multiplie dans une vacuole phagocytaire qui est protégée de la fusion avec les lysosomes et qui éventuellement peut s'agrandir pour occuper tout le volume du cytoplasme de la cellule. Dans la vacuole, le corps élémentaire se différencie en corps réticulé (CR), forme non infectieuse de *Chlamydia* mais capable de synthétiser des macromolécules et de s'autorépliquer. Suite à la multiplication des corps réticulés, il y a acheminement d'antigènes chlamydiens, entre autre la protéine MOMP, à la surface des cellules hôtes eucaryotes. Lors de la dernière étape de l'infection, les corps réticulés se réorganisent en corps élémentaires qui sont libérés dans l'environnement suite à la lyse de la cellule. Ils sont alors capables d'entreprendre un cycle de multiplication sur d'autres cellules intactes (Campbell et al., 1989).

Les *Chlamydia* font partie de la famille des *Chlamydiaceae* qui comprend un seul genre : *Chlamydia*. Le genre *Chlamydia* est divisé en trois espèces pathogènes pour l'homme : *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* et *Chlamydia psittaci* et deux espèces qui n'infectent que les animaux : *Chlamydia pecorum* et *Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis* (Kuo et al., 1995b).

La maladie la plus ancienne associée à une infection par *C. trachomatis* est le trachome qui est la séquelle d'une infection oculaire et la cause bactérienne principale de cécité à travers le monde (Dawson et al., 1981). De plus, *C. trachomatis* est responsable d'infections génitales telles qu'urétrite, cervicite, inflammation pelvienne et de complications : grossesse ectopique et infertilité. Cette bactérie et les maladies qu'elle cause sont depuis quelques années pointées du doigt puisqu'elles sont un réel problème de santé publique à travers le monde. On a estimé à 89 millions le nombre des infections génitales à *C. trachomatis* dans le monde en 1995 (WHO).

Les infections à *C. psittaci* ou psittacoses sont transmises à l'homme par inhalation de particules chlamydiennes libérées par des oiseaux infectés. Les manifestations cliniques sont généralement de la fièvre, de la toux et des éternuements. Il arrive qu'il y ait des manifestations non pulmonaires mais cela est très rare (Peeling et Brunham, 1996).

C. pneumoniae a récemment (Grayston et al., 1986) été décrit comme étant une bactérie pathogène pour l'homme. Elle est responsable d'environ 10% des pneumonies mais elle est aussi associée à une grande variété d'infections respiratoires telles que pharyngites, bronchites et otites (Grayston et al., 1990 ; Saikku, 1992a). Elle est aussi impliquée dans l'asthme et l'obstruction chronique des poumons (Hahn et al., 1991). Ces infections sont généralement sous-cliniques et asymptomatiques mais elles peuvent être aussi très sévères spécialement chez les personnes âgées ou ayant déjà une infection respiratoire. Les études séroépidémiologiques ont montré que la plupart des infections primaires ont lieu à l'âge scolaire et à l'adolescence et que entre 40 et 50% des adultes à travers le monde possèdent des anticorps anti-*C. pneumoniae* (Grayston, 1992). Les infections à *C. pneumoniae* sont également associées à des maladies extra-pulmonaires comme l'arthrite (Braun et al., 1994) et l'athérosclérose (Saikku et al., 1988)

1.2 Biologie moléculaire de la membrane des *Chlamydia* (Antigènes de surface) :

Les *Chlamydia* possèdent de nombreuses caractéristiques membranaires en commun avec les bactéries Gram négatives, cependant elles se distinguent par certains traits qui leur sont spécifiques : le plus important est l'absence de la couche de peptidoglycan responsable de l'intégrité structurale des bactéries. Les *Chlamydia* possèdent en revanche une grande quantité de protéines riches en cystéines dans leur membrane, ces protéines forment un réseau de ponts

disulfures entre elles et avec les autres protéines de la membrane ce qui permet le maintien de la rigidité structurale de la cellule. Les protéines riches en cystéines regroupent la protéine principale de la membrane ou MOMP (40kDa), une protéine entre 57-62kDa ou CrP60 et une protéine de 12 à 15kDa ou CrP12. Elles sont encodées par les gènes *omp1*, *omp2* et *omp3* respectivement. (Raulston, 1995).

L'antigène ou la protéine la plus étudiée et la mieux caractérisée est la protéine MOMP. Elle est la plus abondante à la surface des corps élémentaires infectieux et des corps réticulés, en effet elle représente 60% des protéines totales de la membrane. Les liaisons disulfures qui s'établissent entre les chaînes polypeptidiques de MOMP jouent un rôle important dans le transport et l'ingestion de nutriments puisque cela permet de former des porines (Bavoil et al., 1984) mais aussi dans la rigidité membranaire des corps élémentaires qui en possèdent un grand nombre comparé aux corps réticulés (Newhall and Jones, 1983). Le gène qui code pour la protéine MOMP possède des régions conservées interrompues par quatre domaines variables qui codent pour les parties de MOMP qui sont exposées à la surface de la bactérie. On a séquencé le gène *omp1* de presque tous les serovars de *C. trachomatis* et les nombreuses variations nucléotidiques découvertes dans les domaines variables de chacun de ces sérovars sont responsables de substitution dans la séquence en acide aminé de la protéine et du fait même de la diversité antigénique répandue dans cette espèce (Yuan et al., 1989). L'analyse de la séquence du gène *omp1* de plusieurs isolats de *C. pneumoniae* a montré qu'ils étaient identiques et qu'il y avait une homogénéité génétique au niveau des domaines variables (Carter et al., 1991). Cependant très récemment, Molestina et al (1998) ont séquencé le gène de la protéine MOMP d'un isolat en provenance d'un athérome coronaire et ont montré qu'il diffère des isolats respiratoires. Six nucléotides sont modifiés dans la séquence dont trois sont situés dans les domaines variables de

la protéine. Une seule de ces variations entraîne la substitution non conservée d'un acide aminé et elle est située dans le domaine variable I.

L'importance de la réponse immunologique vis-à-vis de la protéine MOMP de *C. pneumoniae* est très controversée. Campbell et al (1990) ont montré par immunologie avec des sérums de patients infectés par *C. pneumoniae*, que la protéine MOMP n'est pas immunodominante comme c'est le cas pour la MOMP de *C. trachomatis*. Par contre, Iijima et al (1994) et Jantos et al (1997) ont montré que certains, mais pas tous les patients, répondent à une infection à *C. pneumoniae* en produisant une grande quantité d'anticorps anti-MOMP. Enfin, Peterson et al (1996) ont immunisé des souris avec des corps élémentaires de *C. pneumoniae* et ont montré, par Buvarpage Western, que MOMP était une protéine immunodominante. La différence entre ces résultats peut dépendre de la sensibilité des épitopes de MOMP à la dénaturation qui est nécessaire pour réaliser une analyse par western blot. En fait, on sait que *C. pneumoniae* arbore à sa surface une structure très antigénique mais dont la conformation est sensible à la dénaturation par le sodium dodécyl sulfate (SDS) ou insoluble dans le SDS. Cet épitope peut être une protéine individuelle (MOMP comme on le suppose) ou une combinaison de protéines du complexe membranaire de la bactérie et il dépend de la structure tertiaire ou quaternaire de la membrane externe (Christiansen et al., 1997)

Les autres protéines riches en cystéines que l'on a étudiées sont la protéine CrP60 et la protéine CrP12. Elles sont associées à l'enveloppe externe mais elles ne sont pas exposées à la surface des corps élémentaires. Ces protéines sont impliquées dans le maintien de la structure des corps élémentaires mais aussi dans le mécanisme d'adhésion des bactéries aux cellules hôtes. La protéine CrP60 comprend un épitope de 101 acides aminés spécifique du genre. La protéine CrP 12 est une protéine acétylée, transcrite à partir d'un cadre de lecture ouvert (ORF) qui définit la

séquence d'une protéine de 88 acides aminés. Le gène de la protéine CrP60 se trouve à côté de celui de CrP12. Les deux ORF sont transcrits en même temps comme étant un seul opéron et leur expression est synchronisée avec le cycle cellulaire de *Chlamydia*. La transcription a lieu tardivement lorsque les corps réticulés se réorganisent en corps élémentaires (Watson et al., 1995)

En plus des protéines riches en cystéines, on retrouve au niveau de la membrane des *Chlamydia*, une protéine de réponse au stress de 60 kDa (hsp 60) qui est très similaire à la protéine GroEL de *Escherichia coli* et à la hsp60 humaine. Il a été démontré qu'elle était responsable des réactions auto-immunes suite à une infection par *C. trachomatis* et donc impliquée dans la pathogenèse des salpingites (Domeika et al., 1998) et de l'infertilité par obstruction tubaire (Toye et al., 1993). Il existe aussi une autre protéine de réponse au stress de 75 kDa homologue à la DNA-K de *E. coli*. Ces protéines sont communément reconnues comme des antigènes lors d'une infection mais on ne sait pas si elles sont exposées à la surface de la cellule.

Un autre constituant important de la membrane des *Chlamydia*, et le plus abondant après la protéine MOMP, est le lipopolysaccharide (LPS) et malgré cette abondance, il ne semble pas avoir de fonction spécifique lors d'une infection chlamydienne alors que chez la plupart des bactéries Gram négatives, les LPS jouent un rôle important lors de l'interaction avec les cellules hôtes. Les LPS chlamydiens sont une forme tronquée qui a perdu le lipopolysaccharide O et certains des résidus saccharides du core (Herring, 1992). Ils contiennent un épitope spécifique au genre qui est depuis longtemps utilisé dans le diagnostic des infections causées par *C. trachomatis*. Les anticorps anti-LPS spécifiques au genre neutralisent l'infectivité de *C. pneumoniae* in vitro mais pas celle des deux autres membres du genre ce qui suggère que la

structure des LPS et des MOMP qui composent la membrane externe diffèrent dans leurs structures (Peterson et al., 1998).

1.3 Corrélation entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose :

L'association entre les infections à *C. pneumoniae* et l'athérosclérose ne date pas d'aujourd'hui. Déjà en 1940, un gynécologue sud américain proposa que la souche LGV de *C. trachomatis* puisse être responsable de l'occlusion des artères et des vaisseaux lymphatiques. Cette idée est disparue et plus personne ne fit de lien entre les maladies cardio-vasculaires et les infections bactériennes. Bien plus tard, en 1984, suite aux études menées par le docteur K. Mattila sur l'implication des infections aiguës dans le développement des infarctus du myocarde, cette hypothèse refit surface. Mattila et al ont analysé la séroconversion d'un certain nombre de patients pour différents agents infectieux et ils n'ont trouvé que des résultats négatifs. Finalement en 1988, Saikku et al. (1988) ont démontré que 70% de ces sérums présentaient un titre élevé d'anticorps anti-*C. pneumoniae*. Des sérums de patients atteints de maladies coronariennes chroniques ont également été analysés lors de cette étude. Leinonen et al. (1990) ont montré que ces personnes aussi présentaient un titre élevé d'anticorps anti-*C. pneumoniae*. De ces dernières expériences est vraiment née l'hypothèse que *C. pneumoniae* serait peut être impliqué dans les maladies coronariennes et les infarctus du myocarde. Cette hypothèse ne fut pas immédiatement acceptée mais depuis quelque temps les recherches qui visent à la prouver s'intensifient (Saikku, 1997).

1.3.1 Données séroépidémiologiques :

En 1988, Saikku et al réalisèrent la première étude séroépidémiologique explorant la relation entre *C. pneumoniae* et les maladies cardiaques. Ils ont comparé le titre d'anticorps anti-*C. pneumoniae* chez deux groupes de patients (quarante patients présentant un infarctus du myocarde et trente patients ayant une maladie coronarienne chronique) avec une population contrôle saine. Cette étude révéla que la présence d'un titre élevé d'anticorps anti-*C. pneumoniae* coïncide avec la présence de l'une des deux maladies chez les patients. Elle révéla aussi que ces deux groupes de patients présentent une réponse immunologique caractéristique d'une infection chronique à *C. pneumoniae*. Quelques années plus tard, Thom et al (1991 et 1992) ont étudié des patients se présentant pour une angiographie. Ils ont alors découvert que les sujets atteints d'une maladie coronarienne sont ceux qui ont le titre d'anticorps anti-*C. pneumoniae* le plus élevé. Les personnes ayant des artères saines ou sans maladie coronarienne connue, par contre, possèdent des titres d'anticorps très faibles ou inexistantes. L'étude suivante a été réalisée avec du matériel collecté lors une grande étude prospective sur l'incidence des maladies coronariennes (Helsinki heart study). L'objectif de cette étude était de vérifier l'effet de certains médicaments réduisant le taux de cholestérol sur l'incidence des maladies coronariennes. Les sujets recrutés devaient avoir une prise de sang à tous les trois mois. Au cours des cinq ans que dura l'étude, il y a eu 140 arrêts cardiaques. On retrouva 103 sérums ayant appartenu à ces patients et prélevés six mois avant l'événement et 103 sérums de patients n'ayant pas souffert d'infarctus que Saikku et al (1992b) ont utilisé pour rechercher des anticorps anti-*C. pneumoniae* et des complexes immuns (CI). Un haut titre d'anticorps (IgA) et la présence de CI circulants contenant des LPS de *Chlamydia*, marques d'une infection chronique par *C. pneumoniae* se sont révélés des facteurs de risque

indépendants de l'âge, de l'hypertension et du tabagisme pour l'avènement d'un infarctus du myocarde.

Suite à ces résultats, un grand nombre d'études séroépidémiologiques ont été menées par différents groupes et en général, elles ont confirmé que la présence d'un titre élevé d'anticorps anti-*C. pneumoniae* était un facteur de risque pour le développement d'une maladie coronarienne (Melnick et al., 1993 ; Patel et al., 1995 ; Mendall et al., 1995 ; Dahlen et al., 1995 ; Miettinen et al., 1996 ; Blasi et al., 1997).

1.3.2 Études des complexes immuns :

Les CI sont responsables de dommages tissulaires dans de nombreuses maladies et sont impliqués dans la pathogenèse de certaines infections microbiennes chroniques. Des CI ont été retrouvés dans le sérum de patients ayant soit des maladies cardiaques ou vasculaires. Suite à la découverte que *C. pneumoniae* pourrait jouer un rôle dans les maladies coronariennes, on a pensé chercher la présence de CI chlamydien chez les personnes atteintes de ces maladies.

En 1990, Leinonen et al utilisèrent deux méthodes pour détecter la présence de CI contenant des LPS de *C. pneumoniae* : soit la méthode de capture du LPS du complexe grâce à des anticorps anti-LPS ou soit la capture des IgM humains du complexe à l'aide d'un anticorps anti-IgM. Ils montrèrent que des CI contenant des LPS de *C. pneumoniae* sont retrouvés plus fréquemment (57%) chez leurs patients ayant un infarctus du myocarde que chez les patients contrôles sains (12%). Ceci fut confirmé en 1993, lorsque le même groupe de chercheurs montrèrent que 41% des patients ayant une maladie coronarienne diagnostiquée par angiographie avaient des CI

contenant des LPS de *C. pneumoniae* comparativement à 15% chez les témoins. Lors de cette même étude (Linnanmäki et al.), pour s'assurer que les CI contenant des LPS chlamydiens sont la preuve que *C. pneumoniae* et non une autre bactérie du genre est le facteur de risque pour les maladies coronariennes, ils ont dissocié puis identifié les anticorps qui les forment. Les IgG libérés ont réagi fortement par immunoblot avec des protéines antigéniques de *C. pneumoniae* ayant un poids moléculaire de 98kDa et 42 kDa décrites par Campbell et al. (1990).

1.3.3 Présence de *C. pneumoniae* dans les lésions athéromateuses :

Une fois que l'on a démontré l'association entre les maladies cardio-vasculaires et la présence d'anticorps contre *C. pneumoniae*, les chercheurs ont essayé de retrouver la bactérie dans les lésions athérosclérotiques et ainsi confirmer l'implication de cette bactérie dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

En 1992, Shor et al furent les premiers à détecter par microscopie électronique la présence de particules en forme de poire ayant deux parois et ressemblant énormément au corps élémentaire de *C. pneumoniae* dans des plaques athéromateuses d'artères coronariennes prélevées lors d'autopsies pratiquées sur des patients Sud Africains décédés pour la plupart de trauma. Aucun de ces patients n'avait eu de maladie respiratoire récente. Des spécimens de sept patients ont été examinés par immunohistochimie (ICC) en utilisant divers anticorps monoclonaux : anticorps spécifique au genre *Chlamydia*, anticorps anti-*C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* pour révéler que la structure identifiée était *C. pneumoniae*. Dans une autre étude, ces mêmes chercheurs ont détecté *C. pneumoniae* dans les athéromes d'artères coronaires des mêmes autopsies sud africaines par trois méthodes : microscopie électronique, ICC et la réaction de

polymérase en chaîne (PCR) (Kuo et al., 1993 a). Ces résultats furent confirmés lorsqu'on retrouva *C. pneumoniae* dans les macrophages et les cellules du muscle lisse de lésions athéromateuses de patients morts aux États-Unis (Kuo et al., 1993 b).

Un grand nombre d'études se succédèrent visant à mettre en évidence la présence de *C. pneumoniae* dans diverses lésions athérosclérotiques (Grayston et al., 1995 ; Campbell et al., 1995 ; Kuo et al., 1995a ; Ramirez et al., 1996 ; Juvonen et al., 1997 ; Jackson et al., 1997 ; Davidson et al., 1998). Au cours de toutes ces études, on trouva très fréquemment *C. pneumoniae* dans les athéromes et très rarement dans les artères saines. Deux rapports négatifs furent publiés : les auteurs ont été incapables de détecter *C. pneumoniae* par PCR dans les athéromes de patients (Weiss et al., 1996 ; Paterson et al., 1998).

1.3.4 Étude de l'effet des antibiotiques :

Une étape a été franchie dans l'étude de la corrélation entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose lorsque Gupta et ses collègues (1997) ont étudié l'effet de l'azithromycine, un antibiotique reconnu comme étant efficace pour traiter les infections respiratoires causées par *C. pneumoniae*, sur le titre des anticorps anti-*C. pneumoniae* et sur les événements cardio-vasculaires. Au cours de cette étude, ils ont réussi à montrer que six mois après un traitement court à l'azithromycine, les hommes qui ont survécu à un infarctus du myocarde présentaient une baisse significative du taux d'anticorps anti-chlamydia et avaient cinq fois moins de problème cardio-vasculaire.

Une autre étude similaire a été réalisée par Gurfinkel et al. (1997). Ils ont vérifié l'effet d'un autre macrolide anti-chlamydia la roxithromycine chez des patients ayant une angine ou un infarctus du

myocarde sans onde Q. Les résultats montrent une baisse dans les incidents cardio-vasculaires (mort, infarctus et angine récurrente) chez les patients traités. Cependant, cette étude ne montre pas que l'effet bénéfique est restreint aux patients séropositifs pour *C. pneumoniae*.

Les deux études citées plus haut attribuent l'effet bénéfique des antibiotiques sur les maladies cardio-vasculaire à l'élimination de *C. pneumoniae*, la bactérie supposée responsable de l'athérosclérose. Le groupe de Martin (1998) conteste cette conclusion et explique que les antibiotiques agissent plutôt sur les canaux potassiques des macrophages responsables de l'activité athérogénique de ces derniers.

Pour confirmer le rôle de l'azithromycine sur *C. pneumoniae* et par conséquent sur l'athérosclérose, Muhlestein et al. (1998) ont infecté des lapins (modèle animal pour une infection à *C. pneumoniae* et pour l'athérosclérose) avec *C. pneumoniae* puis leur ont administré un traitement à l'azithromycine. Les résultats montrent que la prise de l'antibiotique ralentit le processus de l'athérosclérose induit par l'inoculation de *C. pneumoniae*.

1.3.5 Les modèles expérimentaux :

L'association qui existe entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose a été démontrée par différentes approches dans un grand nombre de laboratoires à travers le monde, mais pour comprendre le rôle exact que joue *C. pneumoniae* dans cette association et pour éliminer l'hypothèse que la bactérie est uniquement un intrus innocent, il faut absolument utiliser des modèles animaux et reproduire l'évolution, étape par étape, de l'athérosclérose.

C. pneumoniae est capable d'infecter les souris (Yang et al., 1993) et les lapins (Moazed et al., 1994) et d'induire des signes pathologiques très similaires à ceux d'une pneumonie ou d'une bronchite chez l'humain. Deux types de lapins sont couramment utilisés comme modèle pour reproduire l'athérosclérose, les lapins blancs de la Nouvelle Zélande (NZW) consommant une diète riche en cholestérol et les lapins Watanabe avec une hyperlipidémie héréditaire (WHHL). Moazed et al. (1996) ont décidé d'évaluer la susceptibilité de ces lapins à une infection à *C. pneumoniae* afin de les utiliser par la suite pour étudier le rôle de *C. pneumoniae* dans l'athérosclérose. Ils ont ainsi découvert que les lapins NZW sont plus susceptibles à *C. pneumoniae* que les lapins WHHL et qu'ils développent, suite à l'inoculation de la bactérie, des pneumonies comme chez l'humain. Ils ont également réussi à démontrer la présence de la bactérie dans le système respiratoire par culture, PCR et ICC. Par contre, ils n'ont pas pu démontrer que ce modèle animal pourrait servir pour l'étude de l'association entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose.

Encore dans le but de trouver un modèle animal susceptible d'éclairer la relation entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose, Fong et al.(1997) ont inoculé des lapins NZW suivant une diète ordinaire avec *C. pneumoniae*. Les analyses pathologiques démontrent des évidences de pneumonie mais aussi dans certains lapins des évidences de lésions athérosclérotiques telles que la présence de cellules spumeuses et de cellules musculaires lisses. De plus, ils ont réussi à isoler et à identifier la bactérie dans les poumons, le foie et les tissus de l'aorte. Ils ont donc conclu que les lapins pouvaient être un bon modèle pour l'étude des infections à *C. pneumoniae* et ses complications telle que l'athérosclérose.

Le groupe de Laitenen (1997) a obtenu des résultats similaires à ceux de Fong : suite à une première inoculation de *C. pneumoniae*, chez certains lapins il a été possible de détecter la

bactérie au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins. Après une ré infection, ces mêmes lapins présentent des signes évidents d'une inflammation de l'aorte similaire à l'athérosclérose alors que les lapins contrôles et les lapins où la bactérie n'a pas été mise en évidence ne présentent aucune lésion. Étant donné que les lapins suivaient un régime normal, les chercheurs en ont conclu que les lésions sont possiblement induites par *C. pneumoniae*.

Très récemment, ce modèle animal a été utilisé par Muhlestein et al. (1998) pour étudier l'effet de l'azithromycine sur l'athérosclérose provoquée par l'inoculation de *C. pneumoniae*. L'aorte des lapins infectés par *C. pneumoniae* présente toutes les caractéristiques des lésions athéromateuses soit l'augmentation de l'épaisseur de l'intima, le rétrécissement du diamètre du vaisseau sanguin, la présence de cellules spumeuses, de cellules musculaires lisses et de plaques fibreuses. Ceci corrobore les résultats précédents. Les lapins infectés par *C. pneumoniae* puis traités à l'azithromycine (antibiotique qui élimine *C. pneumoniae*) ainsi que les lapins contrôles ont des signes moins développés de la maladie. Donc *C. pneumoniae* est responsable de l'accélération des étapes de l'athérosclérose et un traitement aux antibiotiques éliminant cette bactérie prévient cette accélération.

Un autre modèle animal intéressant qui pourrait aider à comprendre l'implication de *C. pneumoniae* dans l'athérosclérose est celui développé par Moazed et al (1997). Ils ont montré que des souris déficientes en lipoprotéine E et qui développent l'athérosclérose spontanément, lorsque inoculées avec *C. pneumoniae* présentent des signes cliniques et pathologiques au niveau des poumons et des anticorps anti-*C. pneumoniae*. L'analyse par PCR et ICC de tissus prélevés sur les poumons, le foie et l'aorte démontre la présence de la bactérie dans ces tissus. *C. pneumoniae* persiste longtemps dans les lésions athérosclérotiques de l'aorte de ces souris mais pas dans les

autres tissus ce qui laisse suggérer que la bactérie infecte d'abord les poumons puis se dissémine vers l'aorte et s'établit préférentiellement dans les lésions.

1.3.6 Quel est le rôle de *C. pneumoniae* dans l'athérosclérose ? :

Lors d'une infection pulmonaire, *C. pneumoniae* est phagocytée par les macrophages bronchoalvéolaires dans lesquels elle est capable de se répliquer. (Gaydos et al., 1996). Cette infection chronique des macrophages donne la possibilité à la bactérie de rejoindre la circulation sanguine (Moazed et al., 1998 et Boman et al., 1998) et ainsi de se disséminer dans l'organisme et d'aller se loger plus particulièrement dans les tissus cardio-vasculaires (Jackson et al., 1997) où elle infecte les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Gaydos et al., 1996).

La suite des événements n'est pas encore très claire. Le rôle que joue *C. pneumoniae* une fois dans les artères dans la formation de l'athérosclérose est encore un mystère même si la plupart des chercheurs pensent que la bactérie est responsable de l'inflammation qui contribue au développement et à la progression de l'athérosclérose comme *C. trachomatis* est responsable de l'inflammation qui contribue au trachome et à l'obstruction tubaire.

L'athérosclérose se manifeste au début de son développement par des lésions au niveau de l'endothélium vasculaire, provoquées par des facteurs de risques comme l'hypercholestérolémie, le tabagisme et le diabète. Suite à ces lésions, les fonctions homéostatiques des cellules endothéliales sont abolies et il y a pénétration accrue de lipides à travers l'endothélium pour se rendre jusqu'à l'intima. Durant la traversée, les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont modifiées et plus précisément elles sont oxydées. Les LDL modifiées jouent un rôle très

important dans la pathogenèse de l'athérosclérose parce qu'elles provoquent et maintiennent les lésions de l'endothélium et par conséquent la mise en place d'une réponse inflammatoire au niveau de l'intima : Les cellules endothéliales expriment à leurs surfaces des molécules telles les sélectines, les VCAM1 et les ICAM1 qui permettent le roulement, l'attachement et l'adhésion ainsi que la migration des monocytes à l'intérieur de la paroi de l'artère. Il y a aussi production d'agents chemotactiques tels que $TNF\alpha$, MCP1, CSF et IL1 par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages.

Une fois les monocytes arrivés dans l'intima, ils se transforment en macrophages qui ingèrent les LDL modifiées via certains de leurs récepteurs. Les macrophages engorgés de lipide ou cellules spumeuses libèrent des substances toxiques qui provoquent des lésions tissulaires majeures.

Lorsque des lésions sont provoquées à l'endothélium, les plaquettes viennent adhérer à cette zone puis sécrètent leur contenu tel que les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) et exposent leur surface procoagulante responsable de l'activation de la prothrombine et thrombine. Le rôle du PDGF libéré est d'activer la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses. Lors du passage de ces dernières dans l'intima, elles synthétisent du collagène, de l'élastine et des mucopolysaccharides qui favorisent le dépôt de lipides et la thrombose (Fuster et al., 1996).

On pense que *C. pneumoniae* stimule et accélère la progression de l'athérosclérose en instaurant par sa présence dans l'organisme une inflammation systémique et locale mais aussi en provoquant une réaction auto-immune.

L'infection des monocytes et macrophages circulants par *C. pneumoniae* stimule la production de nombreux médiateurs de l'inflammation qui jouent un rôle important dans le mécanisme de

l'athérosclérose. Ces monocytes synthétisent des cytokines telles que $TNF\alpha$, IL1 et IL6 (Heinemann et al., 1996 ; Kaukoranta et al., 1996) qui contribuent à endommager l'endothélium vasculaire puisqu'elles sont responsables de l'activation des plaquettes et des fonctions procoagulantes, de la production de protéines de réponse au stress mais aussi elles accroissent le taux de triglycérides et de LDL circulants au détriment des lipoprotéines de haute densité (HDL).

Pour que *C. pneumoniae* puisse contribuer à un processus inflammatoire chronique, il faut qu'elle puisse survivre dans les tissus hôtes durant une très longue période de temps. On sait que *C. pneumoniae* peut se multiplier dans les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses et les macrophages ou cellules spumeuses (Godzik et al., 1995 et Gaydos et al., 1996). Il a aussi été démontré que *C. pneumoniae* est capable d'infecter de façon persistante des cellules in vitro en déjouant le mécanisme médié par l' $INF\gamma$. La mise en place de ce mécanisme a comme conséquence la dégradation du tryptophane et donc l'élimination de la bactérie. *C. pneumoniae* privée de tryptophane interrompt son cycle de vie normal et prend une forme réplivative aberrante (Mehta et al., 1998). Dans les athéromes, l' $INF\gamma$ est produit par les cellules T qui s'infiltrant dans l'artère en même temps que les monocytes et les macrophages.

L'une des caractéristiques de l'athérosclérose est l'accumulation des leucocytes dans les tissus pour répondre à une stimulation antigénique. L'infection des cellules endothéliales par *C. pneumoniae* stimule la production de nombreux médiateurs de l'inflammation qui jouent un rôle dans l'infiltration des monocytes dans les artères. Il y a d'abord synthèse de molécules d'adhésions telles que les ICAM 1 et les VCAM1 (Kaukoranta tolvonen et al., 1996) et aussi des cytokines comme MCP1 et IL8 qui attirent les monocytes vers l'intima (Molestina et al., 1998). L'infection des macrophages par *C. pneumoniae* induit la sécrétion de $TNF\alpha$, une cytokine qui,

entre autre, stimule l'expression de molécules d'adhésions mais aussi de métalloprotéinase, une enzyme qui provoque des lésions tissulaires importantes (Kol et al., 1998). En outre les macrophages infectés par *C. pneumoniae*, sous l'effet de leur LPS, subissent un dérèglement au niveau du métabolisme des lipides qui leur permet d'ingérer des grandes quantités de LDL natifs et de devenir des cellules spumeuses, composante majeure des plaques athéromateuses (Kalayoglu et Byrne, 1998a et b).

La réaction auto-immune, qui pourrait aussi intervenir dans la progression de l'athérosclérose, lorsque *C. pneumoniae* est présente dans les athéromes est le résultat de la présence en grande quantité de la protéine hsp60 chlamydienne. L'INF γ produit par les cellules T infiltrées dans la lésion est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire de *C. pneumoniae*. Dans cette état quiescent la bactérie produit une grande quantité de hsp60 très similaire à la hsp60 humaine produite dans les vaisseaux suite à l'infection ou à la réaction inflammatoire. Il a alors mimétisme moléculaire et mise en place d'une réaction auto-immune (Kol et al., 1998).

De nombreuses études ont exploré la possibilité que *C. pneumoniae* soit responsable de l'athérosclérose. Un grand nombre de preuves lient *C. pneumoniae* à l'athérosclérose mais elles ne sont pas assez concluantes pour affirmer que cette bactérie est l'agent pathogène qui cause l'athérosclérose.

1.4 Méthodes actuelles du diagnostic de *C. pneumoniae* :

Lors des innombrables recherches réalisées visant à éclaircir la relation entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose, différentes techniques de diagnostic de *C. pneumoniae*, que ce soit dans le

sérum ou dans les tissus ont été utilisées : La culture cellulaire, un test sérologique, la détection d'antigène et l'identification de séquence d'ADN spécifique par PCR.

1.4.1 Isolement par culture cellulaire :

L'isolement de *C. pneumoniae* est réalisé sur des cellules Hep-2, H292 ou HL qui sont plus sensibles que les cellules McCoy et Hela229 utilisées pour la culture de *C. trachomatis*. Ces cellules sont centrifugées avec l'inoculum puis incubées à 35°C pendant 48 à 72 heures avec 1µg/ml de cycloheximide, un antibiotique qui freine la croissance cellulaire. Après incubation, il faut confirmer la présence de *C. pneumoniae* dans la culture par un anticorps monoclonal spécifique de l'espèce ou spécifique du genre conjugué à la fluorescéine. (Schachter, 1997) *C. pneumoniae* ne croît pas bien en culture et les inclusions qu'elle forme sont très petites comparées à celles de *C. trachomatis* et *C. psittaci* d'où la difficulté de les identifier. Les spécimens utilisés pour la culture doivent être placés dans un milieu de transport approprié et gardés à 4°C pas plus de 24 heures sinon ils ne sont plus viables. La culture cellulaire est une technique très spécialisée qu'on ne peut effectuer dans tous les laboratoires, néanmoins elle est considérée comme la méthode de référence car la mise en évidence d'une inclusion n'entraîne aucun doute sur la nature de l'infection (Peeling, 1995).

1.4.2 Test sérologique :

La microimmunofluorescence directe (MIF) est réalisée en déposant des gouttes d'antigènes (des corps élémentaires de *C. pneumoniae* purifiés des LPS) sur des lames adaptées. Une série de dilutions de sérum de patient est étalée sur les spots d'antigène puis incubée pendant 30 minutes. La lame est par la suite lavée, séchée et colorée avec un anticorps anti-humain conjugué à la fluorescéine. (Wang and Grayston, 1970 et 1991). Pour interpréter les résultats obtenus par un test MIF, il faut avant tout connaître la réponse immunologique induite par une infection par *C. pneumoniae* chez l'humain. La réponse sérologique suite à une infection à *C. pneumoniae* est très lente et se présente selon deux patrons différents. Lors d'une première infection, on observe l'apparition rapide d'anticorps fixant le complément, trois semaines plus tard apparaissent les IgM et il faut six à huit semaines pour trouver des IgG. En cas de ré infection, la plupart du temps il n'y a pas d'anticorps fixant le complément ni d'IgM mais un titre élevé d'IgG qu'on peut détecter une à deux semaines après l'infection. Donc les critères de diagnostic sérologique de *C. pneumoniae* par MIF sont les suivants : une infection aiguë est reconnue par une augmentation de quatre fois du titre des IgG entre le sérum pris lors de l'infection et le sérum convalescent, un titre d'IgM de 1:16 ou plus ou alors un titre d'IgG de 1:512 ou plus. Une infection passée ou préexistante est définie par un titre d'IgG de 1:16 ou plus mais moins que 1:512 (Kuo et al., 1995 b).

Lors d'un test MIF, l'antigène immunodominant est certainement la protéine principale de la membrane MOMP puisqu'on la retrouve en très grande concentration à la surface des corps élémentaires et réticulés. Malheureusement, en plus des épitopes spécifiques à l'espèce et aux sous-espèces cette protéine possède des épitopes spécifiques au genre reconnus lors d'une

infection et qui donnent lieu à des réactions croisées entre les trois espèces. Outre les réactions croisées entre les trois espèces du genre *Chlamydia* il se produit aussi des réactions croisées avec d'autres bactéries Gram négatives à cause de la présence d'un restant de LPS, qui comme mentionné précédemment possèdent des épitopes spécifiques au genre *Chlamydia*, mais aussi énormément de ressemblance avec les LPS membranaires des autres bactéries Gram négatives. C'est pour ces raisons que plusieurs laboratoires sont incapables d'obtenir des résultats spécifiques de l'espèce et fiables (Ozanne et Lefebvre, 1992).

1.4.3 Détection antigénique :

Deux tests font partie de cette catégorie dont voici une brève description : Pour réaliser un test d'immunofluorescence direct (DFA), il s'agit de fixer sur lame de microscope un frottis d'un spécimen clinique de patient (sécrétion respiratoire, écouvillonnage de gorge...) soit par l'acétone ou le méthanol avant de le faire réagir avec des anticorps monoclonaux spécifiques de l'espèce (dirigés contre le MOMP) ou spécifique au genre *Chlamydia* (dirigés contre les LPS) marqués à la fluorescéine. Cette technique est souvent utilisée dans les laboratoires pour le diagnostic de *C. trachomatis* à cause de sa simplicité et sa rapidité. Un autre avantage du DFA est de ne pas requérir de conditions particulières pour la collecte, le transport et la conservation des spécimens. Cependant la lecture au microscope de chaque spécimen est subjective et dépend de l'expérience du technologiste. Vu le petit nombre de particules chlamydiennes et la multitude de bactéries différentes dans les sécrétions des voies respiratoires, cette analyse est rarement utilisée dans les laboratoires cliniques pour la détection de *C. pneumoniae* (Kuo et al., 1995 b).

Le deuxième test où on détecte les antigènes de *C. pneumoniae* est la technique immunoenzymatique (EIA), basée sur la capture des LPS de *Chlamydia* en utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux fixés à un support solide. Cette technique est bien standardisée, facile à réaliser, adaptée aux grandes séries, n'exige pas de transport rigoureux et la lecture des résultats n'est pas subjective.

Et encore une fois, comme mentionné plus haut, la spécificité de ce test est limitée puisqu'il utilise les LPS. Généralement, on confirme le résultat obtenu par cette technique par un test de blocage ou par un DFA. (Stary, 1997)

1.4.4 Détection des acides nucléiques par PCR :

La réaction de polymérase en chaîne permet l'amplification rapide d'une séquence cible spécifique à un organisme donné grâce à deux amorces d'ADN complémentaires à une séquence dans l'ADN de la bactérie. Plusieurs amorces spécifiques à l'amplification de *C. pneumoniae* ont été mises au point. Elles ont comme cible le gène de l'ARN ribosomal, (Gaydos et al., 1992) le gène de la protéine principale de la membrane externe, (Holland et al., 1990) le gène de la protéine riche en cystéine 60 kDa (Watson et al., 1991) et enfin le gène inconnu de Campbell. (Campbell et al., 1992). Le PCR semble être la technique la plus sensible et la plus spécifique puisqu'on estime la limite de ce test à approximativement dix particules chlamydiennes (corps élémentaires ou réticulés) et qu'on est capable de différencier les trois espèces l'une de l'autre. (Kuo et al., 1995 b)

1.4.5 Utilité d'un test de diagnostic de *C. pneumoniae* :

La plupart des techniques décrites ci haut sont commercialisées et largement utilisées pour *C. trachomatis* étant donné son importance et son implication en santé publique. En revanche, pour *C. pneumoniae* ces tests ne sont utilisés qu'en recherche et ne sont donc pas standardisés et reproductibles. Il est pourtant important de mettre au point un test efficace c'est-à-dire sensible, spécifique, rapide et peu coûteux pour le diagnostic de *C. pneumoniae* afin d'améliorer les soins aux patients, d'orienter l'antibiothérapie et d'identifier formellement l'agent pathogène responsable de la maladie respiratoire. Il importe également afin de faire avancer la recherche sur l'association entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose. La majorité des études menées jusqu'à maintenant emploient le MIF pour détecter les anticorps anti-*C. pneumoniae* ce qui n'est pas une technique de choix à cause des nombreux désavantages cités plus haut.

1.5 Objectif du projet :

Mon projet consiste à mettre au point un test ELISA pour détecter les anticorps anti-*C. pneumoniae* d'abord dans le sérum de patients atteints d'infection pulmonaire et ensuite chez des patients ayant subi des chirurgies cardio-vasculaires afin d'apporter une preuve plus solide de l'implication de *C. pneumoniae* dans l'athérosclérose. La réalisation de ce test sérologique repose sur la production par génie génétique des antigènes les plus importants des trois *Chlamydia* soit la protéine MOMP, la CrP60 et la hsp60. La production des antigènes de *C. trachomatis* et *C. psittaci* est importante pour vérifier et éliminer les réactions croisées qui pourraient affecter la spécificité de l'ELISA. Pour confirmer et approuver le test ELISA, on va essayer de détecter la

présence de *C. pneumoniae* dans le sang et des biopsies d'athérome en mettant au point une technique d'extraction et de PCR efficace.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES :

2.1 La réaction d'amplification de l'ADN avec une polymérase (PCR) :

La technique de PCR permet de sélectionner et d'amplifier un fragment d'ADN à partir d'un mélange. Son principe est basé sur le fonctionnement d'une ADN polymérase. Cette enzyme allonge un court brin d'ADN appelé amorce oligonucléotidique quand il est lié à une matrice d'ADN plus longue, à partir de l'extrémité 3' libre de l'amorce et produit ainsi une copie homologue de la matrice. Avec une deuxième amorce située sur le brin complémentaire de l'ADN, il sera possible d'effectuer des cycles successifs d'amplification au cours desquels l'ADN polymérase allonge les deux amorces fixées à deux points donnés sur les brins antiparallèles d'un ADN pour obtenir un grand nombre de copies de cet ADN. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation de l'ADN (95°C), hybridation des amorces (37°C à 60°C) et extension par l'ADN polymérase (72°C).

Les gènes de la protéine MOMP et de la protéine CrP60 ont été amplifiés à partir des corps élémentaires de *C. pneumoniae* souche TWAR, *C. trachomatis* souche L2 et *C. psittaci* souche 6BC fournies par le LSPQ qu'on a préalablement traités au NaOH pour en extraire l'ADN.

2.1.1 Extraction de l'ADN au NaOH :

On mélange 50 µl d'une préparation contenant des corps élémentaires avec 50 µl de NaOH 2mM. Après centrifugation, on élimine le surnageant et on resuspend le culot dans 50 µl de NaOH 1mM. On chauffe alors à 80°C pendant 10 minutes puis on met sur la glace (Frost et al., 1993). Pour l'amplification des gènes de *C. trachmoatis* et *C. psittaci*, on utilise directement 1µl de l'extrait, en revanche pour *C. pneumoniae* on utilise 1 µl d'une dilution 1/3.

2.1.2 Conditions générales de PCR :

Le PCR est réalisé dans un volume final de 50 µl qui comprend le tampon Roche (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH 8.3), 200 µM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dCTP et dTTP), 1µM de chaque amorce et 1.25 unités de la polymérase *Taq* de Roche et une concentration de MgCl₂ variant de 1.5 mM à 2.5 mM dépendamment du gène à amplifier. La polymérase *Taq* de Roche est une enzyme qui synthétise l'ADN en ajoutant aléatoirement à la fin de la séquence synthétisée un résidu Adénine (A) supplémentaire aux extrémités 3'. Pour certains clonages, où on a eu besoin de gène avec des extrémités franches, on a donc utilisé l'ADN polymérase *Pwo* de Boehringer Mannheim qui possède en plus de son activité polymérase, une activité exonucléase 3'→5'. Cette enzyme a été employée à 2.5 unités dans le tampon qui est fourni (Tris-HCl 10mM pH 8.8, KCl 25mM, (NH₄)₂SO₄ 50mM) avec un supplément de MgSO₄ 0.5 mM. Les autres ingrédients pour la réaction de PCR sont les mêmes qu'utilisés avec la polymérase *Taq*.

Généralement, le PCR se fait dans l'appareil GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer) avec un programme qui comprend 40 cycles avec une température d'hybridation de 55°C.

2.1.3 Conditions particulières à l'amplification du gène *omp1* pour le clonage :

Le gène *omp1* des trois *Chlamydia* a été amplifié avec les amorces KpnCT12 et CT11. KpnCT12 [GGGGTACCCCTTGCGATCCTTG] est une amorce qui a été spécialement conçue à partir de CT12 et qui commence 66 nucléotides après la fin de la séquence « signal » de transport vers l'espace périplasmique et à 135 pb du premier ATG si on se réfère à la séquence de *omp1* de *C. pneumoniae* de Melgosa et al. (1991). CT11 [GCATTTA(C/T)GTGAGC(A/T)GCTCT] est une amorce qui se termine 13 pb avant le codon stop de la fin du gène *omp1* (1134 pb après le premier ATG du gène *omp1* de *C. pneumoniae*). Avec ces deux amorces, la polymérase *Taq* en présence de MgCl₂ 1.5 mM amplifie une grande portion du gène *omp1* soit 1019 pb pour de *C. pneumoniae*, 1036pb pour *C. trachomatis* et 1061pb pour *C. psittaci* et exclu les 22 premiers acides aminés à l'extrémité NH₂ de la protéine MOMP ainsi que le peptide « signal ».

Pour compenser les différences de séquence entre le génome de *C. trachomatis* et *C. psittaci* au niveau de l'amorce CT11, il a fallu employer un programme composé de 5 cycles avec une température d'hybridation à 37°C avant le programme de 40 cycles à une température d'hybridation de 55°C .

2.1.4 Conditions particulières à l'amplification de *omp2* pour le clonage :

Le gène *omp2* codant pour la CrP60 de *C. pneumoniae* a été amplifié grâce à la polymérase *Taq* en présence de $MgCl_2$ 2mM avec une température d'hybridation de 55°C tandis que les CrP60 de *C. trachomatis* et de *C. psittaci* ont été amplifiés avec la polymérase *Pwo* avec un programme qui comprend 40 cycles à 42°C. Les amorces utilisées étaient C-rich *Bam* [CGGGATCCAAACTCATCAGACGA] qui s'apparie tout de suite après le premier ATG qui se situe à la base 112 si on se réfère à la séquence de *omp2* proposée par Watson et al. (1990) et C-rich *Hind* [CCCAAGCTTAATACATGTG(G/T)GTATT(C/T)TCTG] ou C-rich *Hind* *Psit* [CCCAAGCTTAATAAACATGTGTGTTTTCTG] (pour *C. psittaci*) qui se lient jusqu'au codon stop TAA à la base 1782. On a obtenu ainsi un gène amplifié de 1667 pb pour *C. pneumoniae*, 1643 pb pour *C. trachomatis* et 1670 pb pour *C. psittaci* qui comprend la protéine mature et la séquence « signal ».

2.1.5 Détection de *C. pneumoniae* par PCR :

2.1.5.1 Gène de l'ARN ribosomal 16S :

Une séquence de 465pb de l'ARN ribosomal 16S est amplifiée par les amorces CpnA et CpnB spécifiques à *C. pneumoniae* décrites par Gaydos et al. (1992). Pour une amplification optimale on a besoin de $MgCl_2$ 1.5 mM en plus des autres ingrédients du PCR mentionnés dans le paragraphe 2.1.2.

Dans l'optique d'augmenter la sensibilité de cette paire d'amorces, trois stratégies ont été tentées.

Un premier PCR semi niché a utilisé les amorces RRNA975 [ATTAGATACCCT(A/G/T)GTAGTCC] et CpnB suivi d'un PCR CpnA et CpnB.

Le deuxième PCR également semi niché a utilisé les amorces CpnA et RRNA1551R [GGTGATCCAGCC(C/G)CACCTTCC] suivi d'un PCR CpnA et CpnB. Ces amplifications fonctionnent dans les mêmes conditions d'amplification qu'un PCR avec CpnA et CpnB.

La troisième stratégie visait un petit fragment du gène de l'ARN ribosomal niché entre CpnA et CpnB par les amorces cpn1 et cpn2 décrites par Nystrom-Rosander et al. (1997). Un fragment de 289pb est produit en présence de MgCl₂ 2mM et en employant un programme «touch down» au cours duquel la température d'hybridation baisse de 1°C à chaque deux cycles, elle passe donc de 65°C à 55°C, température d'hybridation des vingt derniers cycles.

2.1.5.2 Le gène *omp1* :

On a amplifié le gène de la protéine MOMP par un PCR niché qui débute par un PCR externe avec les amorces Ct3b [GGGAACCCTTCTGA(A/T)CCAAG] et Ct8b [GAACTGACCA(G/T)(A/T)TACGTGAC] qui se branchent respectivement à 78pb et 1140pb du gène *omp1* de *C. pneumoniae* spécifiquement. Le PCR interne a utilisé les amorces Ct12 [GGAGATCCTTGCGATCCTTG] et Ct11 et génère un fragment de 1019pb. Les conditions de ces deux PCR étaient les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 2.1.3.

2.1.5.3 Le gène inconnu de Campbell :

Le gène inconnu de Campbell a été amplifié par les amorces HL1 et HR1 suivit par une amplification par les amorces HM1 et HR1 déterminées par Campbell et al. (1992). On a obtenu un fragment de 229pb. Ces deux PCR ont besoin de $MgCl_2$ 2.5 mM.

2.1.6 Électrophorèse sur gel d'agarose :

Pour vérifier la taille des fragments amplifiés par PCR, on a fait migrer l'ADN sur des gels verticaux ou horizontaux dont la concentration d'agarose a varié de 0.8% à 2% selon la taille des fragments à visualiser. L'électrophorèse s'est réalisée dans un tampon TAE (Tris 40mM, acide acétique 20mM, EDTA 1mM) à environ 120V. Les gels ont été colorés au bromure d'ethidium (EtBr) à 2 μg / ml avant d'être visualisés aux UV (254nm) et photographiés.

2.2 Clonage dans les vecteurs d'expression :

Le clonage est une technique qui permet d'insérer dans un vecteur donné un ADN étranger pour mieux étudier ses fonctions ou pour exprimer son produit en grande quantité. Les vecteurs d'expression pMAL-p₂ et pMAL-c₂ (New England BioLabs) ont été utilisés lors de ce projet pour cloner les gènes des protéines MOMP et CrP60 puis ensuite pour les exprimer. Les gènes de ces protéines sont insérés en aval du gène *malE* de *E. coli* qui encode pour la protéine de liaison au maltose (maltose binding protein MBP). On obtient ainsi l'expression de protéines de fusion avec la MBP qui permet la purification de ces dernières en une seule étape grâce à son affinité pour

l'amylose. Le promoteur « tac » ainsi que le signal d'initiation de la transcription de *malE* permettent une forte expression de la séquence clonée suite à son induction par l'IPTG.

Pour cloner les oligonucléotides CHLAM HS1 et CHLAM HS2, nous avons également eu besoin du vecteur pUC19.

2.2.1 Endonucléases de restriction

Les enzymes employées pour le clonage proviennent de Pharmacia ou de New England Biolabs et elles ont été utilisées selon les recommandations du fabricant.

2.2.2 Préparation des vecteurs et des inserts pour le clonage :

L'ADN des vecteurs est produit dans les bactéries *Escherichia coli* DH5 α et extrait par une modification de la lyse alcaline décrite par le Gouill et al. (1994) où l'acide formique est remplacé par l'acide acétique. La préparation d'ADN est ensuite traitée à la RNase (0.5 μ g/ μ l), quantifiée sur gel d'agarose et obligatoirement purifiée sur colonne de fibre de verre en présence d'un tampon guanidine-thiocyanate commercialisé sous le nom de « High pure PCR product purification kit » par Boehringer Mannheim. Ceci permet d'éliminer toutes protéines et ADN de petites tailles qui pourraient interférer lors de la digestion ou de la ligation. Les vecteurs sont digérés avec les enzymes de restriction appropriées et à nouveau purifiés sur colonne de fibre de verre.

L'ADN à cloner dans le vecteur a été obtenu par PCR, que ce soit le gène de la protéine MOMP ou CrP60. Il a été digéré par les enzymes de restriction puis purifié sur gel d'agarose à faible point de fusion. On a récupéré la bande d'ADN qui nous intéresse en éliminant l'agarose grâce à la trousse « Wizard PCR preps DNA purification system » de Promega en suivant les directives du fabricant.

2.2.3 Ligation et transformation :

Le vecteur et l'ADN à cloner ont été digérés avec des enzymes de restriction qui génèrent des bouts cohésifs compatibles et ensuite liés ensemble par le biais de la T4 DNA ligase (Pharmacia) selon le protocole établi par la compagnie mais dans un tampon constitué de Tris-HCl 25mM pH 7.5, MgCl₂ 5mM, PEG 8000 2.5% et dithiothréitol 0.5mM (DTT). On a utilisé 10ng de l'ADN de la ligation pour transformer dans les bactéries *E. coli* DH5α (F⁻ Ø80d *lacZ* ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻,m_k⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1) compétentes (subcloning efficiency DH5α competent cells, Gibco BRL) ou dans les bactéries *E. coli* AD494 (Δ*ara*⁻ *leu7697* Δ*lacX74* Δ*phoA PvuII phoR* Δ*malF3* F'*[lac+ (lacI^q)pro]* *trxB* : :kan) compétentes (Novagen) en suivant le protocole fourni par les fabricants.*

2.2.4 Extraction de l'ADN plasmidique et vérification des clonages :

L'ADN plasmidique a été récupéré par lyse alcaline et traité à la RNase puis digéré par les enzymes de restriction qui permettent d'identifier les colonies qui possèdent l'ADN cloné voulu.

La visualisation de ce résultat s'est fait sur gel d'agarose.

2.3 Induction de l'expression des protéines :

2.3.1 Conditions d'induction :

On a commencé par inoculer le milieu SOB (bactotryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 10mM et KCl 2.5mM) par le centième de son volume d'une culture d'une nuit de la bactérie qui contient le clone désiré. On a incubé la culture à 37°C avec agitation jusqu'à obtenir une densité optique (600nm) de 0.5 et ensuite on a ajouté l'IPTG pour avoir une concentration finale de 5mM et on a poursuivi l'incubation pendant une heure à 37°C quand il s'agissait des protéines MOMP et des peptides CHLAM HS alors que pour les CrP60, on ajoute de l'IPTG 1mM et on poursuit l'incubation pendant trois heures à température ambiante.

2.3.2 Extraction de la protéine suite à l'induction :

La première partie du protocole qu'on a utilisé pour extraire les protéines est inspirée de l'article de Derman et al.(1993). Les bactéries induites ont été centrifugées puis resuspendues dans 1/10 du volume de culture d'une solution Tris/glucose (glucose 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH8). Elles ont alors été traitées au lysozyme (2mg/ml) avant d'être lysées par trois cycles de gel et dégel. Après centrifugation pendant 20 minutes à 12000 RPM, le surnageant obtenu (extrait brut) contient les protéines solubles et le culot (matière insoluble) contient les protéines insolubles. Le culot de protéines restées insolubles a été récupéré et solubilisé par le tampon urée (Tris-HCl 0.1 M pH 8.3, urée 8M). Pour ce faire, nous avons resuspendu le culot de protéines dans le tampon urée et nous l'avons incubé ensuite avec agitation pendant 15 minutes à température ambiante. Cet extrait urée est alors centrifugé à 12000 RPM pendant 20 minutes pour éliminer les débris encore insolubles.

2.3.3 Électrophorèse des protéines en présence de SDS:

La visualisation des protéines exprimées et la détermination de leurs poids moléculaires ont été réalisées d'après le système de Laemmli (1970). Les gels utilisés étaient composés de 10% acrylamide (29 :1) et avaient une épaisseur de 1.5mm. La migration a été effectuée pendant quatre heures à 140 V.

Les échantillons à déposer ont été mélangés avec un volume égal de tampon de dissociation (Tris-HCl 50mM pH 6.8, SDS 2%, bleu de Bromophénol 0.1%, glycérol 10% et DTT 100mM) et chauffés 5 à 10 minutes à 90°C.

Ces gels ont servi à réaliser des buvardages Western ou ils ont été colorés au bleu de Coomassie pendant une nuit avec une solution (méthanol 50%, acide acétique 7%, bleu de Coomassie 0.2%) puis ils ont été décolorés grâce à une solution de décoloration (méthanol 50%, acide acétique 7%).

2.3.4 Transfert électrophorétique sur nitrocellulose (buvardage Western) :

À cause du grand nombre de protéines produites par *E. coli*, il nous a été parfois impossible de discerner notre protéine par une coloration au bleu de Coomassie. Nous avons donc effectué des buvardages Western, en transférant les protéines après migration sur gel d'acrylamide sur nitrocellulose (Hybond ECL) de Amersham Life Science dans un tampon Tris-glycine (glycine 192mM, Tris 25mM et méthanol 25%). L'appareil de transfert (Trans Blot Cell) de BioRad est placé à 4°C pendant six heures à 70 Volts.

2.3.5 Révélation des protéines par des anticorps spécifiques et détection ECL :

Après le transfert, la membrane de nitrocellulose a été bloquée avec 10% de lait dans du TBS-Tween (Tween20 0.2% dans du TBS [Tris 20mM et NaCl 0.5 M pH 7.5]). L'anticorps primaire (anti-MBP de New England BioLabs) a été dilué 1/10000 dans la solution de TBS-Tween

contenant 1% de lait et incubé avec la membrane de nitrocellulose une heure à température ambiante. Après deux lavages de cinq minutes avec du TBS-Tween, la membrane a été incubée avec la protéine G couplée à la peroxydase (Sigma) à une dilution de 1/5000 dans du TBS-Tween contenant 1% de lait pendant une heure à température ambiante.

La révélation s'est faite par chimiluminescence grâce à la trousse « ECL Western blotting detection reagents » selon les directives d'Amersham. Des films autoradiographiques (Hyperfilm ECL) ont été exposés pendant 10 secondes à 5 minutes à la membrane puis ils ont été développés dans un processeur automatique (Kodak).

2.3.6 Purification des protéines sur colonne :

Le culot de protéines bactériennes solubilisé par l'urée a d'abord été dilué dix fois dans une solution de glycine 500mM avant d'être mélangé à une résine d'amylose préalablement équilibrée avec le tampon de colonne (Tris-HCl 10mM pH 8.3, urée 0.8M, glycine 500mM, EDTA 1mM). Le mélange a été incubé à température ambiante avec agitation pendant 30 minutes, puis transféré dans une colonne. La résine a été lavée avec le tampon de colonne puis la protéine de fusion a été éluée avec un tampon d'éluion (Tris-HCl 10mM pH8.3, urée 0.8M, glycine 500mM, EDTA 1mM, maltose 10mM). Nous avons récupéré ainsi dix fractions de 1ml.

La quantité de protéines que contenait chaque fraction a été déterminée par la méthode de Bradford (1976).

2.4 Test ELISA :

2.4.1 Préparation des plaques :

Dans les puits d'une plaque « High binding » de Costar, on a déposé 75ng de la protéine d'intérêt diluée dans un tampon carbonate à pH 9.6 (50mM) et on a incubé pour la nuit à 4°C. Une fois que les protéines se sont liées à la plaque, on a bloqué les surfaces encore libres des puits avec de la BSA 3% dans un tampon TBS-Tween pendant 3 heures à température ambiante. Entre-temps, on a préparé les sérums comme mentionné au paragraphe 2.4.2. Après cinq lavages de la plaque avec du TBS-Tween, on a déposé les sérums dans les puits et on a incubé 1 heure à température ambiante. Une autre série de cinq lavages a été effectuée avant de déposer l'anti-IgG humain couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch) dilué 1/100000 dans du TBS-Tween contenant de la BSA 1% pour une incubation de 1 heure à température ambiante. La plaque a été de nouveau lavée puis on a ajouté la tetramethylbenzidine (TMB). On a incubé 10 minutes avant de stopper la réaction avec du H₂SO₄ 1N. La densité optique a été mesurée à 450nm avec le Behring ELISA Processor II (Behring).

2.4.2 Adsorption des sérums :

On a adsorbé les sérums avec les protéines totales de *E. coli* extraites de la même façon que nos protéines de fusions chlamydiennes (voir paragraphe 2.3.2). On a préparé une culture bactérienne induite de bactéries AD494 transformées avec le vecteur pMALc₂ qu'on a utilisé pour produire

un extrait brut et un culot de matière insoluble. Cette matière insoluble a été solubilisée avec de l'urée 8M puis dilué avec de la glycine 500mM.

Nous avons calculé que la quantité de protéine déposée par puits de la plaque de microtitration provenait d'environ 62.5µl de culture bactérienne initiale. Nous avons donc adsorbé chaque sérum avec les protéines totales issues de 62.5µl de culture bactérienne. Pour préparer 100µl de sérum dilué 1/200 (la quantité qu'on dépose par puits), on a ajouté 12.5µl d'extrait 8M urée dilué dans la glycine et 6.25µl d'extrait brut à 81.25µl de TBS-Tween contenant 1% de BSA . On a incubé ce mélange avec 0.5µl de sérum du patient pendant 1 heure à température ambiante puis on a centrifugé pendant 10 minutes à 13000 RPM avant de déposer le surnageant dans la plaque.

2.5 Extraction de l'ADN du plasma des patients :

Lorsque les spécimens de sang des patients ayant subi une chirurgie vasculaire nous sont parvenus, ils ont été mélangés avec une solution Tween 20 / NaOH (Tween 20 0.1% et NaOH 1mM) puis centrifugés 30 minutes à 3700 RPM. Le culot obtenu a été resuspendu dans 1.5 ml de Tween 20 / NaOH puis recentrifugé 5 minutes à 14,000 RPM. Les culots a été conservés à -70°C jusqu'à utilisation.

Cinq techniques ont été testées : La matrice InstaGene de BioRad, la trousse « QIAamp Blood Kit and QIAamp tissue Kit » de Qiagen en suivant exactement les instructions données par les compagnies. Nous avons aussi testé une modification du protocole élaboré par Moazed et al.(1997) : Le culot a été resuspendu dans 100µl de Tris 100mM pH 8, EDTA 25mM et TritonX-100 2% plus 200µg /ml de protéinase K et incubé entre une et deux heures à 55°C puis soumis à

une extraction au phenol-chloroforme. Une autre technique a consisté en une extraction au STM (Tris 0.13% et SDS 0.4%) plus diluant (Roche) analogue à l'extraction de *C. trachomatis* des sécrétions génitales : on a resuspendu le culot dans 100µl de STM et on a ajouté 100µl de diluant. Ce mélange a été laissé trois jours à 4°C avant de faire le PCR. La dernière technique a été une extraction au NaOH au cours de laquelle on a resuspendu le culot dans 100 µl de solution Tween 20 / NaOH puis on a chauffé 10 minutes à 80 °C.

2.6 Extraction de l'ADN des tissus (biopsies d'artères) :

2.6.1 Extraction par billes de verre dans du STM :

Un échantillon de tissu a été placé dans un tube en verre en présence de 500 µl de STM (Roche), on a ajouté des billes de verre jusqu'à deux millimètres du ménisque et on a agité au vortex 30 secondes. Par la suite on a fait une extraction au phenol-chloroforme sur le liquide récupéré. À 100 µl de surnageant, nous avons ajouté 100 µl de diluant (Roche) et nous avons incubé trois jours à 4°C pour réduire les inhibiteurs de PCR (Toye et al., 1996).

2.6.2 Extraction au STM et protéinase K :

Un morceau de tissu a été placé dans un tube contenant 500 µl de STM (Roche) puis on a ajouté 200 µg/ml de protéinase K et on a incubé toute une nuit à 55°C. Une extraction au phenol-

chloroforme a été réalisée sur le lysat tissulaire obtenu. Après trois jours de conservation au froid (4°C), on a ajouté un volume égal de diluant.

2.6.3 Extraction par billes de verre dans le tampon selon Moazed et al.(1997) :

On a placé le morceau de tissu dans un tube de verre contenant 500 µl de tampon Moazed et 200 µg/ ml de protéinase K. On a ajouté les billes de verre et on a agité au vortex quatre fois 30 secondes. Le tube a ensuite été placé dans un bain à 55°C pour la nuit. Le lendemain, le surnageant a été récupéré et soumis à une extraction avec de l'hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) puis au phenol-chloroforme. Ce même protocole a été testé en éliminant l'extraction au CTAB.

Trois autres méthodes ont été évaluées, la trousse Qiagen, la trousse « DNA isolation Kit puregene » de Gentra systems et la matrice BioRad

3 RÉSULTATS :

Pour mettre au point le test ELISA qui permettra de détecter la présence d'anticorps anti-*C. pneumoniae* chez les patients, la première étape est de produire une grande quantité de l'antigène qui sera adsorbé aux plaques de 96 puits. Étant donné qu'il est extrêmement fastidieux de produire les Chlamydia en culture de cellules mais aussi qu'il en faudrait une quantité énorme pour extraire par la suite les antigènes de surface (MOMP, CrP60 et hsp60) qui nous intéressent, nous avons décidé de contourner ces problèmes en produisant par génie génétique les protéines d'intérêts.

3.1 Clonage des antigènes des trois *Chlamydia* :

3.1.1 Clonage du gène codant pour la protéine MOMP de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* :

La protéine immunodominante lors d'une infection chlamydienne est la protéine MOMP tout au moins en ce qui concerne *C. trachomatis* et *C. psittaci*. Nous pensons que c'est également le cas pour *C. pneumoniae* mais on a jamais encore pu le prouver car toutes les expériences (buvardage Western) réalisées jusqu'à maintenant utilisaient une protéine dénaturée. Pour *C. pneumoniae*, les

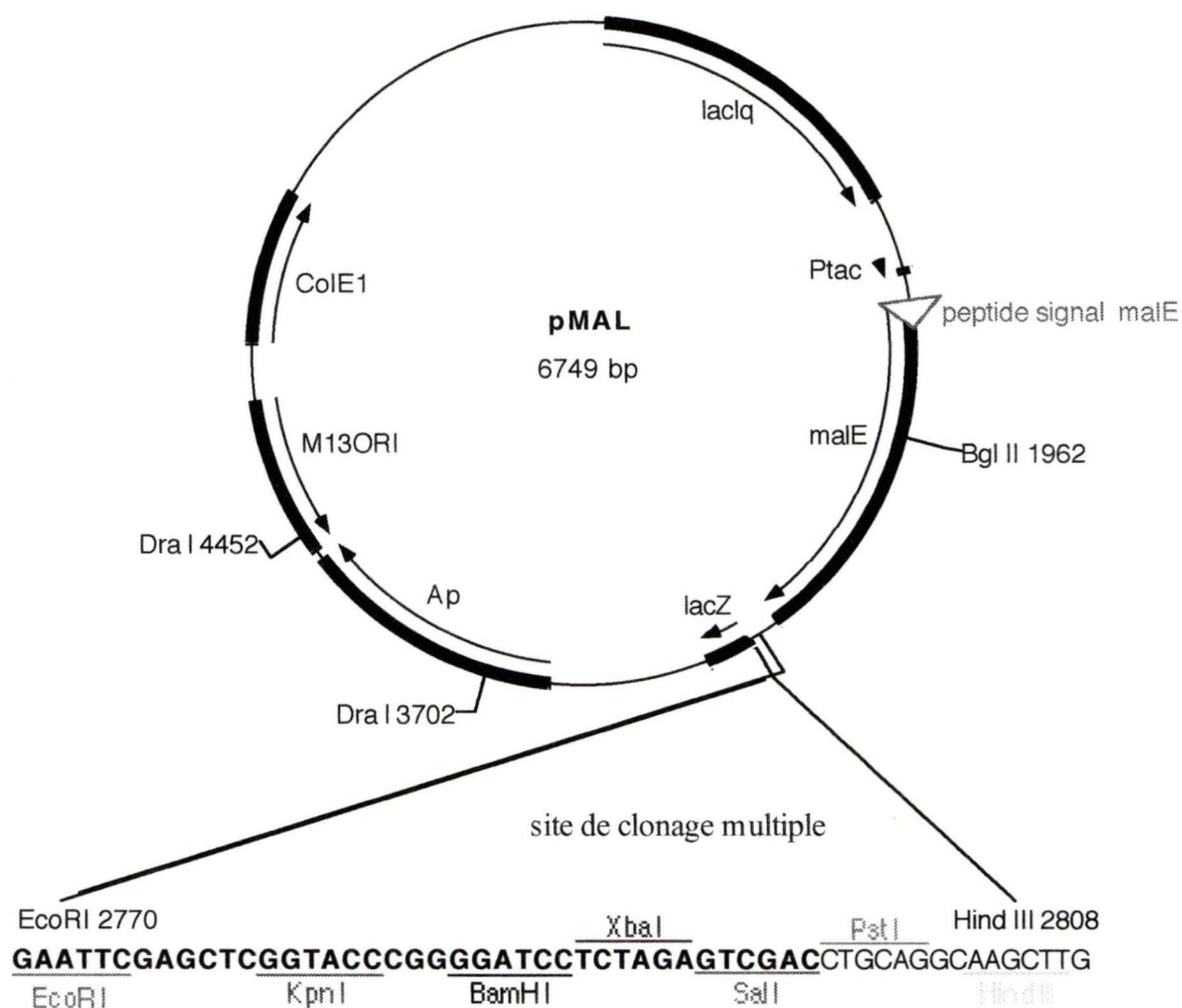
épitopes les plus importants sont conformationnels et non linéaires comme ceux de *C. trachomatis* et *C. psittaci*. Ce test ELISA devait nous donner une réponse à propos de ce dilemme puisque nous allons utiliser une protéine native produite par *E. coli*.

Nous avons donc cloné le gène *omp1* des trois espèces du genre *Chlamydia* dans les vecteurs d'expression pMAL-p₂ et pMAL-c₂ qui permettent une expression élevée de la protéine clonée. Ces vecteurs ont été modifiés légèrement au niveau du site de clonage multiple pour introduire des sites de restriction qui n'y existaient pas (voir figure #1). Nous avons tenté de cloner la grande majorité de la protéine pour s'assurer la présence de la totalité des épitopes linéaires et conformationnels sur la protéine exprimée et ainsi détecter tous les anticorps produits par l'organisme contre la protéine MOMP lorsqu'il est mis en présence de *Chlamydia*.

Pour le clonage de MOMP des trois *Chlamydia*, pMAL-p₂ et pMAL-c₂ (dont nous avons modifié le site de clonage multiple en y substituant le fragment EcoRI/SalI du site du clonage multiple de pUC19) sont digérés par KpnI (site de restriction présent sur l'amorce Kpn-Ct12 ayant servi au PCR) et XbaI, enzyme qui coupe MOMP à 1045 pb environ 114 pb en amont de Ct11. L'utilisation de ces deux enzymes de restriction nous permet de cloner 910 pb du gène *omp1* de *C. pneumoniae*, 928 pb du gène *omp1* de *C. trachomatis* et 952 pb du gène *omp1* de *C. psittaci*. Les cartes de ces plasmides sont présentées à la figure # 2.

3.1.2 Clonage des oligonucléotides CHLAM HS1 et CHLAM HS2 :

On a découvert que la protéine de réponse au stress hsp60 bactérienne est responsable des complications (trachome, infertilité et grossesse ectopique) qui surviennent suite à une infection à



La séquence signal de malE est déléetée dans pMALc2.

La séquence en gras dans le site de clonage multiple provient de pUC19.

Figure # 1 : Schéma des vecteurs d'expression pMAL modifiés: Insertion d'une partie du site de clonage multiple de pUC19 (fragment EcoR I - Sal I) dans le site de clonage multiple des vecteurs pMAL pour augmenter le nombre de sites de restriction de ces derniers.

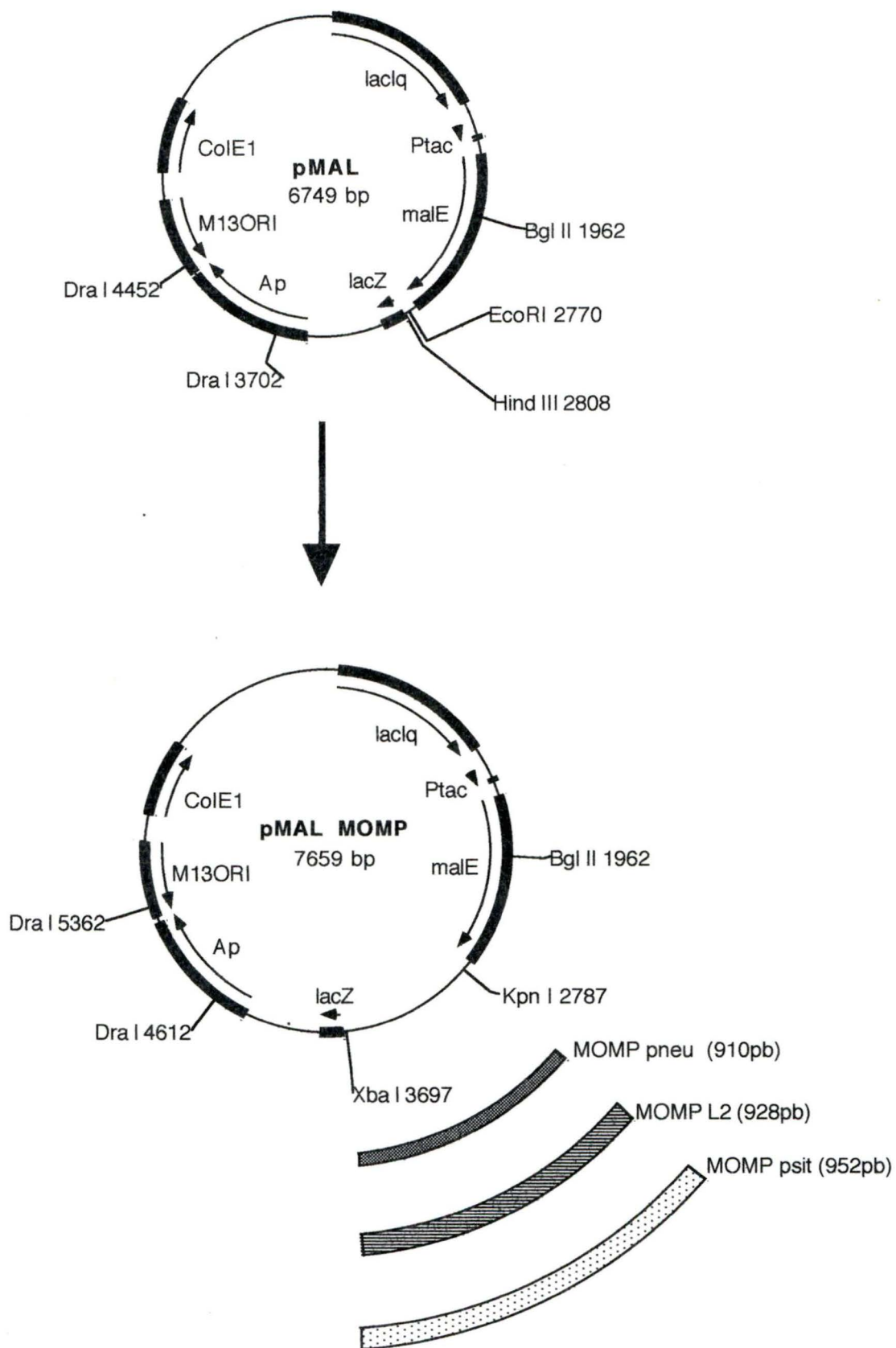


Figure # 2 : Clonage du gène *omp1* des trois espèces du genre *Chlamydia* dans les vecteurs pMAL.

* Les valeurs représentées sur la carte se réfèrent au clonage du gène *omp1* de *C. pneumoniae*.

C. trachomatis. Elle entraîne une réaction auto-immune, qui génère des dommages tissulaires au niveau des yeux et des voies uro-génitales, à cause des anticorps produits contre certains de ces épitopes très similaires à ceux de la hsp60 humaine. Comme l'athérosclérose est une maladie qui implique le système immunitaire, on a voulu savoir si la protéine hsp60 de *C. pneumoniae* ne joue pas au niveau des artères le même rôle que la hsp60 de *C. trachomatis* au niveau des trompes de Fallope. Si c'est le cas, les personnes atteintes d'athérosclérose produiraient un taux élevé d'anticorps anti-hsp60.

Pour produire le test ELISA qui nous permettra de détecter la présence des anticorps anti-hsp60, nous avons synthétisé deux oligonucléotides : CHLAM HS1 (GATCCATTAAATATAATGAAGAAGCCAGGAAAAAATACATAAAGGCGTAAAAAC TCTTGCAGAAGCAGTACA) qui code pour un épitope spécifique au genre *Chlamydia* dans la portion C-terminale de la protéine déterminé par Yuan et al.(1992) et CHLAM HS2 (GATCCAACGCAGGTAAAGAAGGCGCTATCATTTGTGAGCAAGTTCTGCA) qui code pour un deuxième épitope spécifique au genre *Chlamydia* dans la portion N-terminale de la protéine déterminé par Yajun et al. (1993). Les protéines hsp60 des trois *Chlamydia* ne diffèrent que peu entre elles, donc l'utilisation de CHLAM HS1 et CHLAM HS2 pour le clonage et l'expression permettra de détecter les anticorps contre la protéine hsp60 de n'importe laquelle des espèces de *Chlamydia* tout en éliminant les épitopes qui pourraient produire des réactions croisées avec d'autres micro-organismes ou avec la hsp60 humaine.

Les épitopes CHLAM HS1 et CHLAM HS2 ont été synthétisés sous forme d'oligonucléotides simple brin portant des hémi-sites BamHI en 5' et PstI en 3'. Nous les avons d'abord clonés dans pUC19 digéré par BamHI et PstI. CHLAM HS1 et CHLAM HS2 sont kinasés pour leur ajouter des phosphates aux extrémités 5' puis ils sont ligués au vecteur. Une fois que l'on a obtenu des

clones positifs pour les deux oligonucléotides, nous les avons transférés dans pMAL-p₂ et pMAL-c₂ en digérant par Sau3A pour ressortir un fragment d'ADN de 999 pb pour HS1 et 975 pb pour HS2 qu'on a introduit dans les deux vecteurs digérés par BamHI et phosphatasés pour empêcher leur recircularisation. On a vérifié ensuite que les colonies qui contenaient le fragment Sau3A étaient dans la bonne orientation par un traitement HindIII qui doit donner environ 1000pb. Pour éliminer la portion HindIII supplémentaire provenant du vecteur pUC19, on a digéré les clones positifs par HindIII puis on a recircularisé le vecteur (voir figure # 3).

3.1.3 Clonage du gène codant pour la protéine CrP60 de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* :

Les études de la réponse sérologique humaine suite à une infection à *C. pneumoniae* ont remarqué une réaction très forte avec les protéines de 98kDa, 68kDa et 60kDa qui font partie de la famille des protéines riches en cystéines qui composent la membrane externe des *Chlamydia*. Jusqu'à très récemment, la seule de ces trois protéines à avoir été séquencée et sur laquelle on avait des renseignements était la Crp60 (60kDa) encodée par le gène *omp2*. Nous avons voulu donc vérifier si par ELISA, on pouvait détecter les anticorps produits contre cette protéine.

Afin de cloner la protéine CrP60, les vecteurs pMALp₂ et pMALc₂ ont été digérés par BamHI et HindIII, les deux enzymes dont les sites de clivage se trouvent dans les amorces pour le PCR. Puisque l'enzyme HindIII n'est pas capable de couper près de l'extrémité d'un fragment d'ADN, nous avons été obligés de faire des concatémères avec les gènes *omp2* produits par PCR pour que l'extrémité qui contient l'amorce avec le site Hind III soit liée à un autre fragment. Suite à la

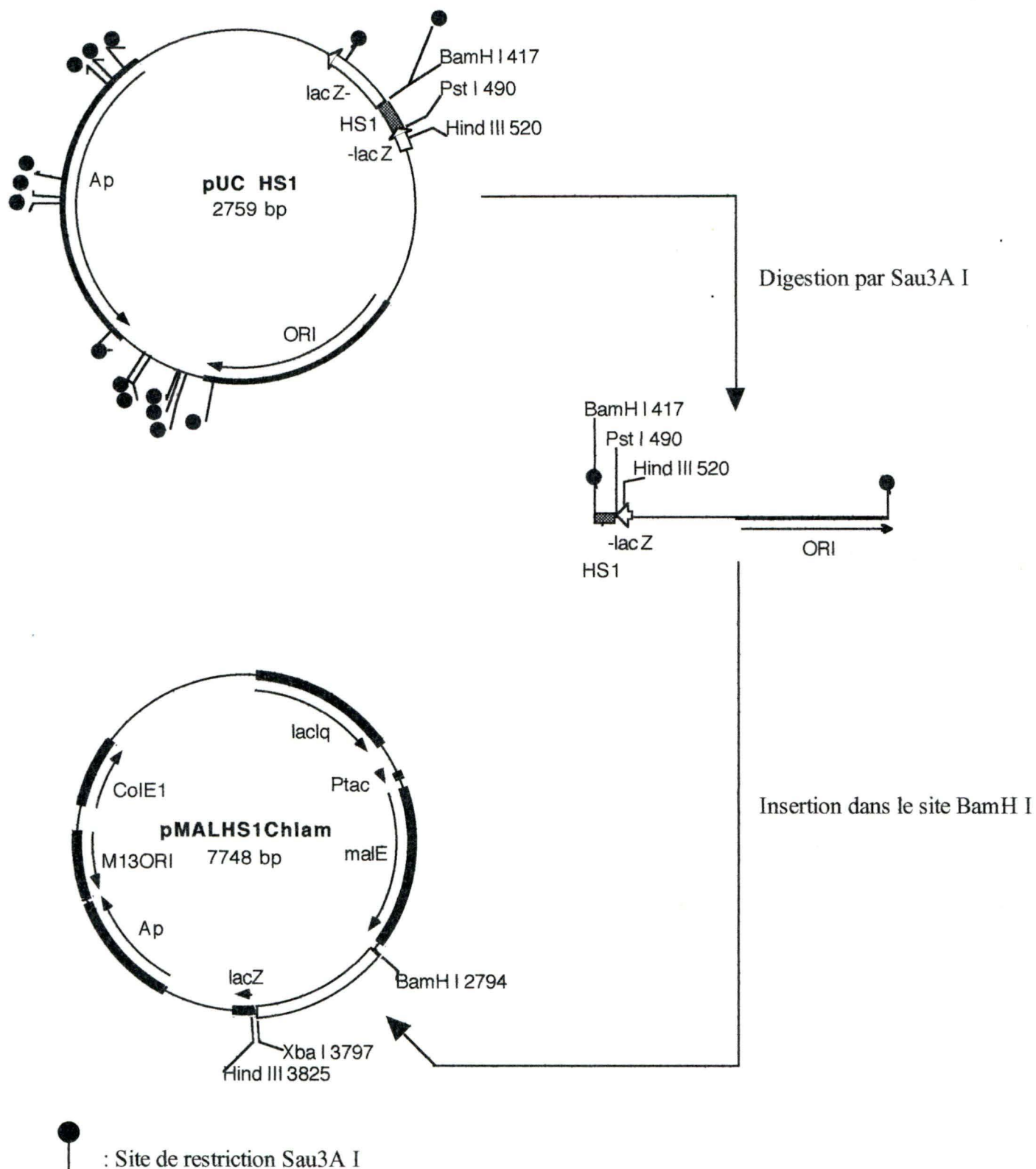


Figure # 3 : Clonage de l'oligonucléotide CHLAM HS1 dans le vecteur pUC19 puis son transfert dans les vecteurs pMAL.

* Le clonage de l'oligonucléotide CHLAM HS2 a été réalisé de la même façon.

digestion par HindIII, on a digéré par BamHI pour finalement insérer le gène *omp2* dans le vecteur (voir figure # 4).

3.2 Production des protéines clonées :

3.2.1 Induction des protéines clonées :

Après avoir réussi à cloner les gènes des protéines qui nous intéressent, il a fallu s'assurer que parmi les clones obtenus il y en existait qui étaient capables d'exprimer nos protéines. Nous avons donc testé quelques colonies pour chaque protéine et nous avons ainsi repéré celles qui produisent les protéines d'intérêts. Le défi avec les colonies que nous avons choisies pour chaque protéine était maintenant de trouver des conditions d'induction et d'extraction capables de nous donner une protéine soluble.

Les conditions optimales d'induction des protéines clonées dans pMAL-p₂ ont été déterminées en variant la concentration d'IPTG (0.3mM, 0.5mM et 1mM) et la température d'induction (37°C et température ambiante) pour une durée de 3 heures. Nous n'avons remarqué aucune différence significative entre ces conditions en ce qui concerne la quantité de protéine exprimée (voir figure # 5) et la solubilité de la protéine (voir figure # 6) . Nous avons donc choisi de travailler avec de l'IPTG à 1mM à température ambiante parce que dans la littérature ce sont les conditions qui permettent d'avoir une production de protéine soluble. Une fois que nous avons commencé à travailler avec les agents dénaturants, il n'était plus nécessaire de continuer à employer des

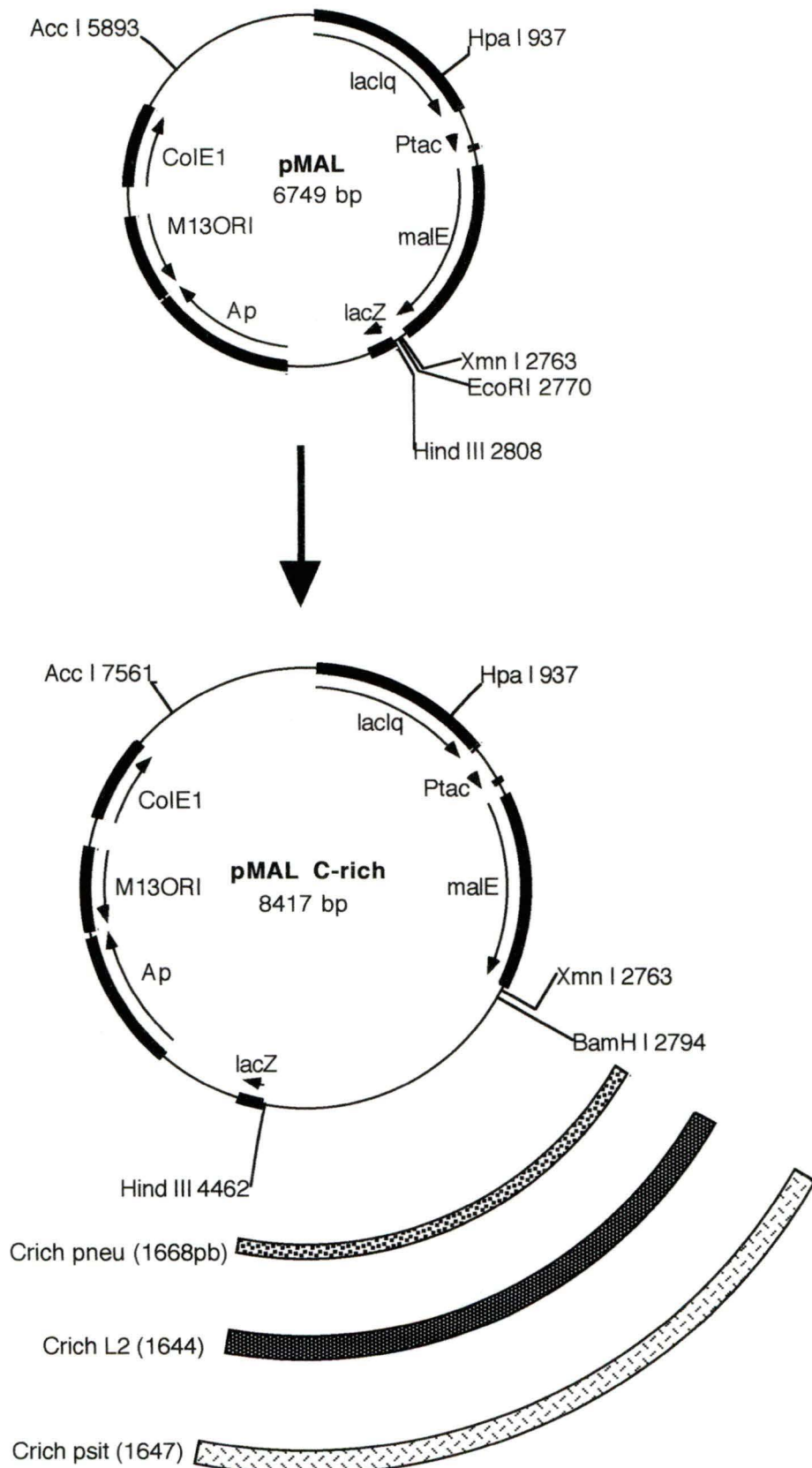


Figure # 4 : Clonage du gène de la protéine CrP60 des trois membres du genre *Chlamydia* dans les vecteurs pMAL.

* Les valeurs représentées sur la carte se réfèrent au clonage du gène de la CrP60 de *C. pneumoniae*.



Figure # 5 : Détermination des conditions optimales d'induction de la production de la MOMP de *C. trachomatis*, variation de la température et de la concentration d'IPTG.
Buvardage Western avec un anticorps anti-MBP qui révèle la protéine fusion.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction avec de l'IPTG 1mM à température ambiante.

Piste 3 : Protéines totales de la bactérie après induction avec de l'IPTG 0.5mM à température ambiante.

Piste 4 : Protéines totales de la bactérie après induction avec de l'IPTG 0.3mM à température ambiante.

Piste 5 : Protéines totales de la bactérie après induction avec de l'IPTG 1mM à 37°C.

Piste 6 : Protéines totales de la bactérie après induction avec de l'IPTG 0.5mM à 37°C.

Piste 7 : Protéines totales de la bactérie après induction avec de l'IPTG 0.3mM à 37°C.

* : MBP (\approx 40Kda).

> : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (\approx 80Kda).

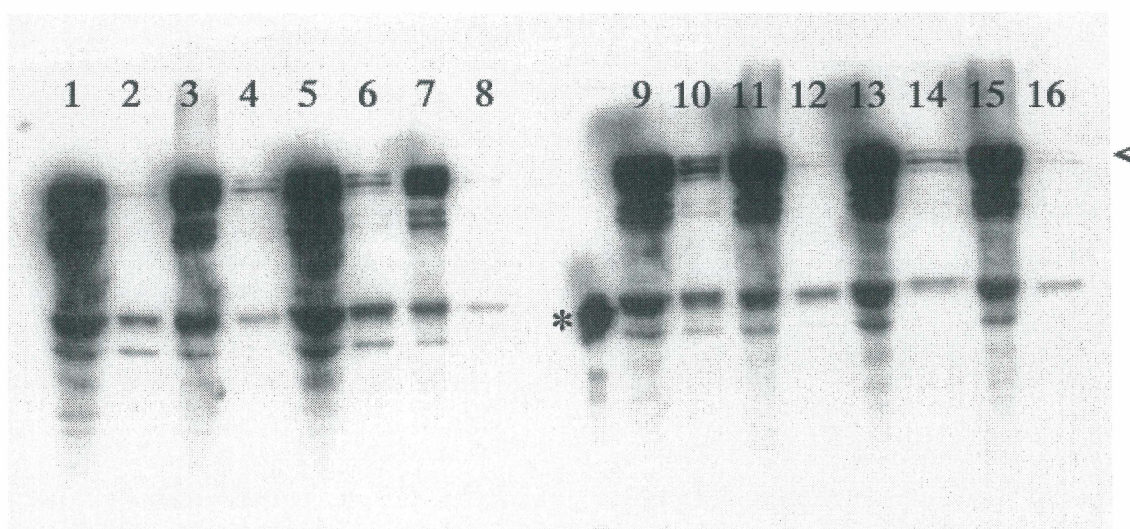


Figure # 6 : Influence des conditions d'induction sur la solubilité de la protéine MOMP de *C. trachomatis* et sur son extraction.

Buvarbage Western avec un anticorps anti-MBP qui révèle la protéine fusion.

- Pistes (1, 5, 9 et 13) : Protéines totales de la bactérie après induction.
- Pistes (2, 6, 10 et 14) : Extrait brut de la lyse bactérienne.
- Pistes (3, 7, 11 et 15) : Matière insoluble de la lyse bactérienne.
- Pistes (4, 8, 12 et 16) : Protéines de l'espace périplasmique après choc osmotique.
- Pistes (1, 2, 3 et 4) : Induction avec de l'IPTG 0.3mM à 37°C du gène *omp1* de *C. trachomatis* cloné dans pMALp₂
- Pistes (5, 6, 7 et 8) : Induction avec de l'IPTG 1mM à 37°C du gène *omp1* de *C. trachomatis* cloné dans pMALp₂.
- Pistes (9, 10, 11 et 12) : Induction avec de l'IPTG 0.3mM à température ambiante du gène *omp1* de *C. trachomatis* cloné dans pMALp₂.
- Pistes (13, 14, 15 et 16) : Induction avec de l'IPTG 1mM à température ambiante du gène *omp1* de *C. trachomatis* cloné dans pMALp₂.

* : MBP (≈ 40KDa).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (≈ 80KDa).

conditions d'induction qui améliorent la solubilité de la protéine mais des conditions qui donnent la plus grande quantité de protéine à savoir de l'IPTG 5mM et une heure à 37°C ainsi que mentionné par Derman et collaborateurs (1993).

L'emploi des vecteurs pMAL-p₂ et pMAL-c₂ dans *E. coli* DH5α a permis l'induction d'une bonne quantité de la protéine MOMP de *C. trachomatis* mais de très faibles quantités de MOMP de *C. pneumoniae* et *C. psittaci* alors qu'une grande quantité des trois protéines MOMP a été produite par le vecteur pMAL-c₂ dans *E. coli* AD494 (voir figure #7). Toutefois, l'expression de la protéine CrP60 n'a été possible qu'en utilisant le plasmide pMAL-p₂ dans les bactéries DH5α et une induction avec de l'IPTG 1mM pendant trois heures à température ambiante.

Les peptides HS1 et HS2 clonés dans pMAL-p₂ et pMAL-c₂ ont eu un taux d'expression semblable et que nous avons jugé satisfaisant quand ils ont été produits en utilisant la DH5α. Nous n'avons donc pas procédé à leur transfert dans la souche AD494.

3.2.2 Extraction des protéines clonées :

La mise au point des conditions d'induction, de la méthode d'extraction et de purification a été faite en utilisant la protéine MOMP de *C. trachomatis* et nous avons ensuite procédé de la même façon avec la protéine MOMP de *C. pneumoniae* et *C. psittaci* ainsi qu'avec les peptides CHLAM HS1 et CHLAM HS2. Quelques modifications du protocole établi ont été nécessaires pour l'extraction de la protéine CrP60 des trois *Chlamydia*.

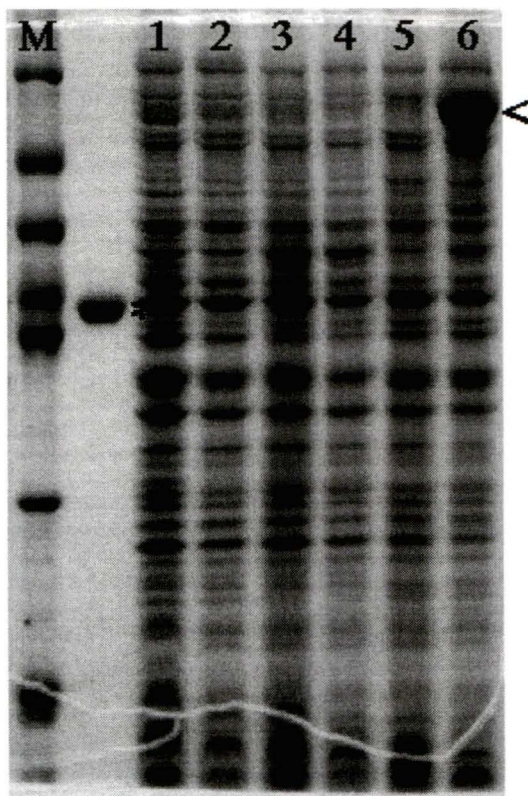


Figure # 7 : Comparaison entre l'efficacité d'induction des clones de pMALp₂ et pMALc₂ contenant le gène *omp1* introduits dans les bactéries DH5 α et du clone de pMALc₂ contenant le gène *omp1* transféré dans les AD494

Pistes (1 et 2) : Expression du gène *omp1* de *C. pneumoniae* cloné dans le vecteur pMALp₂ dans les bactéries DH5 α .

Pistes (3 et 4) : Expression du gène *omp1* de *C. pneumoniae* cloné dans le vecteur pMALc₂ dans les bactéries DH5 α .

Pistes (5 et 6) : Expression du gène *omp1* de *C. pneumoniae* cloné dans le vecteur pMALc₂ dans les bactéries AD494

Pistes (1, 3 et 5) : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Pistes (2, 4 et 6) : Protéines totales de la bactérie après induction.

* : MBP (\approx 40KDa).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. pneumoniae* plus la MBP (\approx 80KDa).

Avec le système pMAL deux méthodes pour extraire les protéines sont proposées par New England Biolabs suivant la localisation de la protéine. On l'extrait soit par lyse bactérienne si elle est dans le cytoplasme ou par choc osmotique si elle est dans l'espace périplasmique. Nous avons choisi de travailler avec le vecteur pMAL-p₂, qui possède un peptide signal en amont du site de clonage multiple permettant l'acheminement de la protéine clonée dans l'espace périplasmique, malgré le fait qu'il produit une plus faible quantité de protéine. Trois raisons nous ont guidé vers ce choix, la première est que seules les protéines dans l'espace périplasmique sont capables de se replier en formant des ponts disulfures et la seconde raison est que cet espace est moins riche en protéines et donc la protéine clonée est plus facile à purifier et troisièmement les MOMP et les Crp60 sont normalement présentes dans l'espace périplasmique chez les *Chlamydia*.

Des expériences pilotes pour extraire la protéine MOMP de *C. trachomatis* ont été effectuées en suivant le protocole de lyse bactérienne et de choc osmotique. Ces premières expériences ont montré que la protéine MOMP exprimée par un clone dans pMAL-p₂ ne s'est pas dirigée vers l'espace périplasmique mais est restée dans le cytoplasme sous forme insoluble (voir figure # 8). Donc le choix que nous avons fait d'utiliser pMAL-p₂ ne tient plus puisque aucune des deux premières raisons de ce choix ne pourra se réaliser.

Des modifications dans le protocole de lyse bactérienne de New England Biolabs ainsi que d'autres méthodes d'extraction ont été réalisées pour découvrir une méthode d'extraction plus efficace. En essayant d'améliorer le protocole de New England Biolabs, nous avons fait varier le tampon de lyse de pH5 à pH8 (voir figure # 9) . On a aussi essayé d'extraire la protéine en brisant les bactéries avec des billes de verre (méthode utilisée pour extraire l'ADN chromosomique des levures, Current protocols in molecular biology) avec le tampon (Tris 0.1M, EDTA 50mM, SDS 1% pH8) ou avec le tampon de lyse de New England Biolabs (phosphate 10mM,

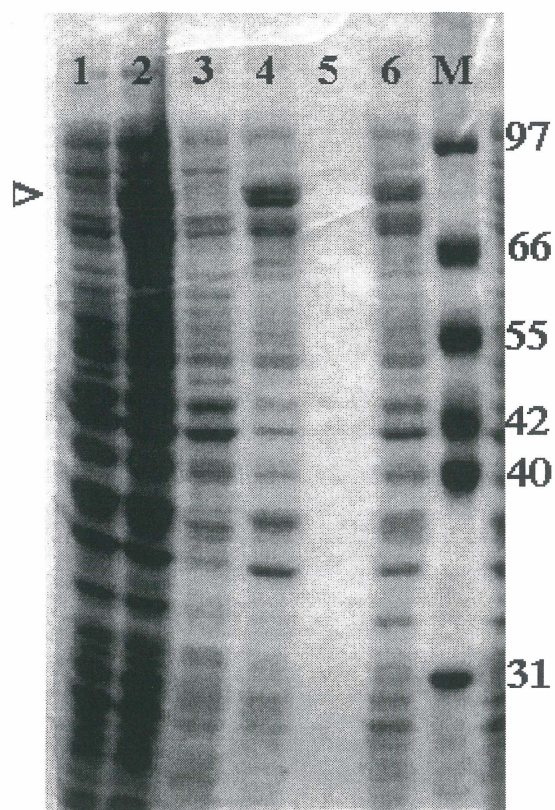


Figure # 8 : Extraction selon les recommandations de New England Biolabs de la protéine MOMP de *C. trachomatis* exprimée par pMALp₂ : Profils des protéines présentes dans les différentes fractions obtenues suite à la lyse bactérienne et au choc osmotique.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction.

Piste 3 : Extrait brut de la lyse bactérienne.

Piste 4 : Matière insoluble suite à la lyse bactérienne.

Piste 5 : Protéines de l'espace périplasmique après choc osmotique.

Piste 6 : Protéines cytoplasmiques après choc osmotique.

M : Marqueur de poids moléculaire en KDa.

▼ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (≈80KDa).

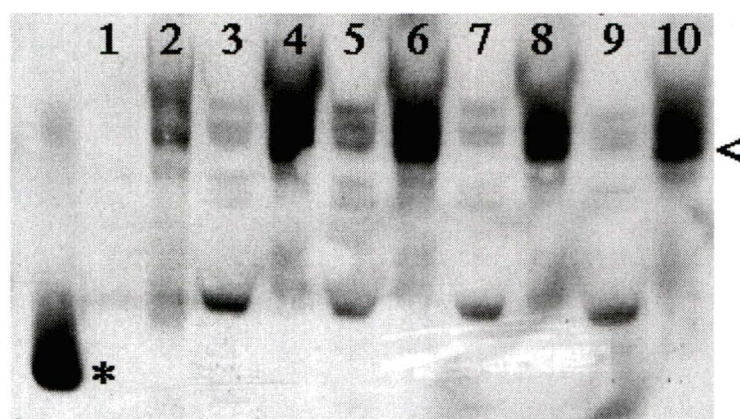


Figure # 9 : Modification du pH du tampon de lyse de New England Biolabs et l'effet de ce changement sur la solubilité de la protéine MOMP de *C. trachomatis* exprimée dans pMALp₂.

Buvardage Western avec un anticorps anti-MBP qui révèle la protéine fusion.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction.

Pistes (3 et 4) : Protéines extraites par le tampon de lyse de New England Biolabs à pH5.

Pistes (5 et 6) : Protéines extraites par le tampon de lyse de New England Biolabs à pH6.

Pistes (7 et 8) : Protéines extraites par le tampon de lyse de New England Biolabs à pH7.

Pistes (9 et 10) : Protéines extraites par le tampon de lyse de New England Biolabs à pH8.

Pistes (3, 5, 7 et 9) : Extrait Brut.

Pistes (4, 6, 8 et 10) : Matière insoluble.

* : MBP (≈ 40KDa).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (≈ 80KDa).

NaCl 30mM, Tween 20 0.25%, β -mercaptoéthanol 10mM, EDTA 10mM, EGTA 10mM). On a également testé une extraction par gel-dégel au cours de laquelle on a alterné congélation des bactéries dans la glace sèche et décongélation à 37°C, six à sept fois (voir figure # 10). Nous avons découvert en essayant toutes ces méthodes que le protocole de New England Biolabs avec un tampon de lyse à pH6 était le seul à donner une protéine partiellement soluble et non dénaturée. Une partie de la protéine s'est retrouvée désormais dans l'extrait brut et non dans le culot. Étant donné que nous n'obtenions que très peu de protéine MOMP de *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, cette méthode n'aura pas permis de les extraire.

Les protéines MOMP sont des protéines très riches en cystéine et par conséquent elles possèdent de nombreux ponts disulfures impliqués dans leur repliement. Le problème d'insolubilité que nous avons rencontré peut être dû à un repliement incorrect de la protéine qui était destinée à l'exportation vers l'espace périplasmique mais qui en réalité ne s'y rend pas et reste dans le cytoplasme. Pour vérifier cette hypothèse nous avons cloné à nouveau le gène *omp1* des trois *Chlamydia* dans pMAL-c₂, le plasmide qui produit une protéine cytoplasmique et nous avons essayé la méthode d'extraction par lyse bactérienne à pH6. Les résultats furent les mêmes qu'avec pMAL-p₂: on obtient une protéine cytoplasmique insoluble (voir figure # 11). Donc la protéine MOMP forme des corps d'inclusions insolubles car elle s'est repliée de façon incorrecte.

Pour remédier à ce problème d'insolubilité sans avoir recours aux extractions dénaturantes qui pourraient dans notre cas détruire les épitopes conformationnels et nous empêcher de détecter certains des anticorps humains produits contre cette protéine considérant que la plupart des anticorps anti-*C. pneumoniae* semblent être dirigés contre des épitopes de ce type, nous avons introduit les plasmides pMAL-c₂ MOMP dans les bactéries AD494 déficientes en thioredoxine

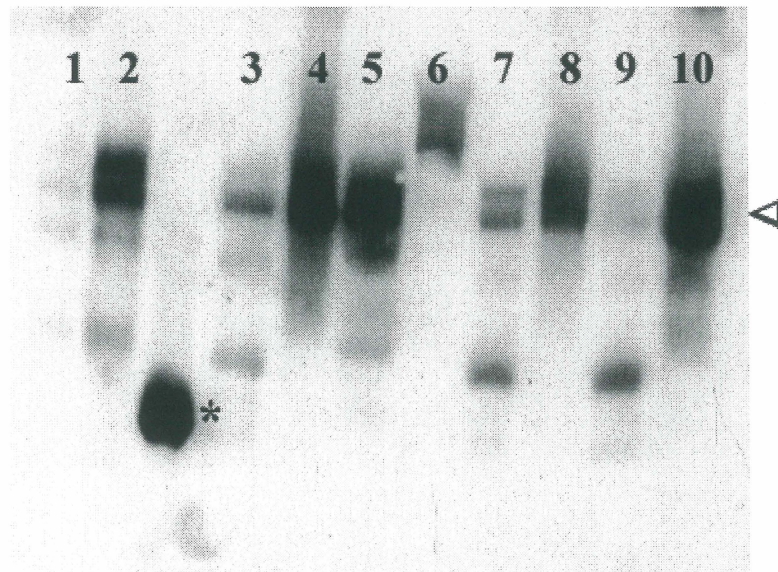


Figure # 10 : Tentative d'extraction par d'autres méthodes que celle de New England Biolab (si possible non dénaturantes) de la protéine MOMP de *C. trachomatis* exprimée par pMALp₂
Buvardage Western avec un anticorps anti-MBP qui révèle la protéine fusion.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction.

Pistes (3, 5, 7 et 9) : Extrait brut.

Pistes (4, 6, 8 et 10) : Matière insoluble.

Pistes (3 et 4) : Protéines extraites par le tampon de New England Biolabs à pH8.

Pistes (5 et 6) : Protéines extraites par les billes de verre et leurs tampon habituel.

Pistes (7 et 8) : Protéines extraites par les billes de verre et le tampon de New England Biolab pH8.

Pistes (9 et 10) : Protéines extraites par une série de gel-dégel.

* : MBP (≈ 40Kda).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (≈ 80Kda).

réductase (trxB) et de ce fait capables de former des ponts disulfures dans leur cytoplasme. Nous espérons que la protéine MOMP serait alors repliée correctement et donc soluble et facile à extraire.

Avec cette nouvelle bactérie, on a testé la méthode d'extraction par lyse bactérienne à pH6 mais aussi nous avons procédé à l'induction et à l'extraction de la protéine en utilisant le protocole proposé par Derman et al (1993) dans l'article qui nous a guidé vers les bactéries AD494 (voir figure # 11). Encore une fois nos efforts pour extraire la protéine ont échoué, elle se trouve toujours dans la matière insoluble. La nouvelle bactérie n'a pas rempli ses fonctions au niveau des ponts disulfures, par contre, elle a remédié à un autre problème qui est la quantité de la protéine exprimée. Des concentrations élevées de la protéine MOMP de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* ont été produites dans les bactéries AD494 que ce soit avec les conditions d'induction mises au point avec pMAL-p₂ ou avec celles de Derman et al.

N'ayant plus aucun moyen pour extraire la protéine avec des méthodes douces, nous avons décidé d'essayer certains détergents et dénaturants chaotropiques (urée 8M, Hydrochlorure de guanidine 6M, Triton 0.2% combiné à du NaCl 1M, Triton 2% combiné à du SDS 0.1 % et STM Roche) sur le culot de protéines insolubles obtenu suite à la lyse bactérienne par un traitement au lysozyme suivi d'une série de gel et dégel (voir figure # 12). Nous voulions ainsi déterminer laquelle des solutions était la plus efficace pour solubiliser notre protéine. Les plus prometteuses se sont avérées les solutions avec l'urée et avec la guanidine. Le handicap de ces dénaturants c'est qu'ils sont absolument incompatibles avec la résine d'amylose qui sert à purifier la protéine, ils devront donc être éliminés avant la purification.

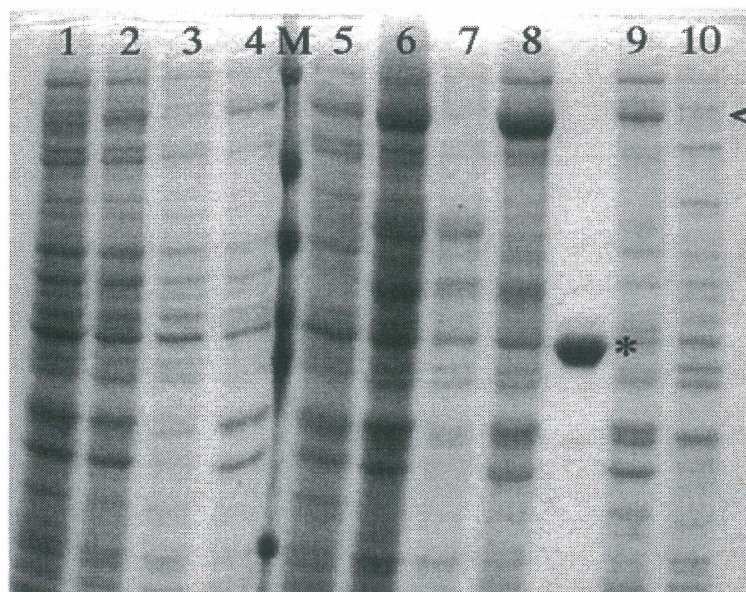


Figure # 11 : Extraction de la protéine MOMP de *C. trachomatis* exprimée par pMALc₂ induit dans les bactéries DH5 α ou AD494.

Pistes (1 et 5): Protéines totales de la bactérie avant induction.

Pistes (2 et 6) : Protéines totales de la bactérie après induction.

Pistes (3, 7 et 10) : Protéines de l'extrait brut.

Pistes (4,8 et 9) : Protéines de la matière insoluble.

Pistes (3 et 4) : Extraction de la protéine MOMP de *C. trachomatis* clonée dans pMALc₂ à partir des bactéries DH5 α par lyse bactérienne de New England Biolabs.

Pistes (7 et 8) : Extraction de la protéine MOMP de *C. trachomatis* clonée dans pMALc₂ après transfert dans les AD494 par lyse bactérienne de New Engalnd Biolabs.

Pistes (9 et 10) : Extraction de la protéine MOMP de *C. trachomatis* clonée dans pMALc₂ après transfert dans les AD494 par lyse bactérienne de Derman et al.(1993).

* : MBP (\approx 40KDa).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (\approx 80KDa).

M : Marqueur de poids moléculaire en kDa.

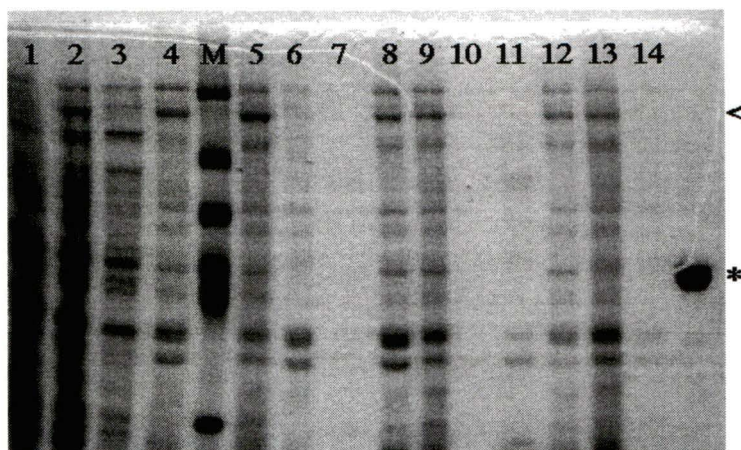


Figure # 12 : Solubilisation par différents agents dénaturants de la protéine MOMP de *C. trachomatis* se trouvant dans la matière insoluble:

- Piste 1 : Protéines totales de la bactérie non induite.
- Piste 2 : Protéines totales de la bactérie exprimant la protéine MOMP de *C. trachomatis* à partir de pMALc₂ transformé dans les AD494.
- Piste 3 : Extrait brut.
- Piste 4 : Matière insoluble.
- Piste 5 : Surnageant de la solubilisation par l'urée 8M de la matière insoluble.
- Piste 6 : Culot de la solubilisation par l'urée 8M de la matière insoluble.
- Piste 7 : Surnageant de la solubilisation par du Triton 0.2 % combiné à du NaCl 1M.de la matière insoluble.
- Piste 8 : Culot de la solubilisation par du Triton 0.2 % combiné à du NaCl 1M de la matière insoluble.
- Piste 9 : Surnageant de la solubilisation par du Triton 2 % combiné à du SDS 0.1%.de la matière insoluble.
- Piste 10 : Culot de la solubilisation par du Triton 2 % combiné à du SDS 0.1%.de la matière insoluble.
- Piste 11 : Surnageant de la solubilisation par le STM de Roche de la matière insoluble.
- Piste 12 : Culot de la solubilisation par le STM de Roche de la matière insoluble.
- Piste 13 : Surnageant de la solubilisation par la guanidine 6M de la matière insoluble.
- Piste 14 : Culot de la solubilisation par la guanidine 6M de la matière insoluble

* : MBP (≈ 40Kda).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (≈ 80Kda)

M : Marqueur de poids moléculaire en kDa.

Lorsque nous avons réussi à mettre au point la procédure à suivre pour extraire la MOMP de *C. trachomatis*, nous avons voulu l'appliquer pour extraire les protéines CrP60 des trois membre du genre *Chlamydia*. Après avoir extrait à l'urée le culot de protéines insolubles, nous avons découvert qu'elle ne permettait pas l'extraction des protéines CrP60 comme cela avait été le cas pour les protéines MOMP et les peptides CHLAM HS (voir figure # 13). La protéine CrP60 est une protéine beaucoup plus riche en ponts disulfures que la protéine MOMP. Nous avons donc pensé que, si l'on combinait à l'urée une certaine concentration de DTT (agent réducteur) et qu'on laissait agir le mélange à différentes températures, nous pourrions trouver des conditions qui permettent d'obtenir une protéine soluble. On a donc ajouté à 8M urée du DTT 1.6 mM et nous avons laissé incuber ce mélange avec le culot de protéines à température ambiante pendant 1 heure ou pendant toute une nuit ou bien on l'a incubé à 56°C pendant 30 minutes ou encore à 37°C pendant 1 heure (voir figure # 14). Les quatre conditions mentionnées ont permis de solubiliser un peu la CrP60 donc, c'est l'ajout de DTT qui a été déterminant et non le temps ou la température d'incubation.

3.2.3 Purification sur colonne d'amylose des protéines clonées:

Les vecteurs pMAL sont des vecteurs qui induisent l'expression de la protéine clonée fusionnée à la maltose binding protein (MBP). Cette protéine est l'outil qui permet la purification de la protéine d'intérêt. Elle est capable de se lier à une résine d'amylose et par conséquent d'être retenue alors que les protéines de *E. coli* sont éliminées.

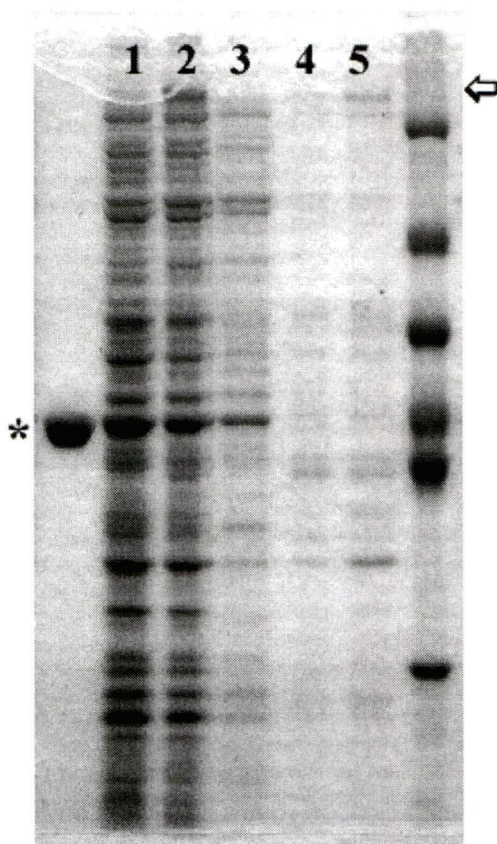


Figure # 13 : Extraction par l'urée et la guanidine de la protéine CrP60 de *C. pneumoniae* à partir de la matière insoluble.

Piste 1: Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2: Protéines totales de la bactérie DH5 α après induction du vecteur pMALp₂.

Piste 3: Extrait brut.

Piste 4: Extrait 8M urée.

Piste 5: Extrait 6M guanidine.

* : MBP (\approx 40Kda).

⇨ : Protéine fusion CrP60 de *C. pneumoniae* plus la MBP (\approx 100Kda).

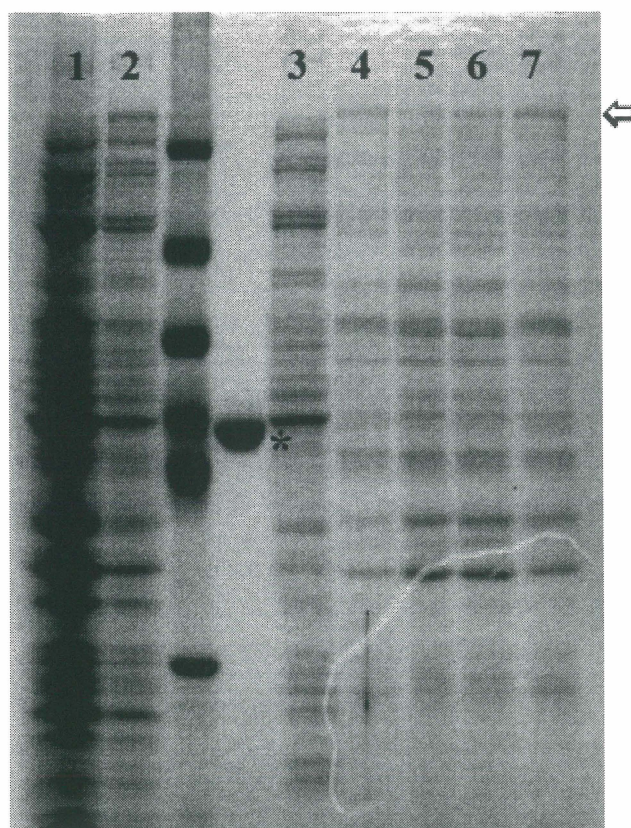


Figure # 14 : Effet du temps et de la température d'incubation d'un agent réducteur (DTT) combiné à l'urée (8M) dans l'extraction de la protéine CrP60 à partir de la matière insoluble.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie DH5 α après induction du vecteur pMALp₂.

Piste 3 : Extrait brut.

Piste 4 : Extrait 8M urée/ 1.6mM DTT incubé 1 heure à 37°C.

Piste 5 : Extrait 8M urée/ 1.6mM DTT incubé toute une nuit à température ambiante.

Piste 6 : Extrait 8M urée/ 1.6mM DTT incubé 1 heure à température ambiante.

Piste 7 : Extrait 8M urée/ 1.6mM DTT incubé 30 minutes à 56°C.

* :MBP (\approx 40Kda).

► :Protéine fusion CrP60 de *C. pneumoniae* plus la MBP (\approx 100Kda).

L'extrait final que l'on a obtenu et qui contenait notre protéine était composé d'une concentration élevée en urée (8M), on ne pouvait donc pas l'utiliser tel quel pour le déposer sur la résine d'amylose. Il était nécessaire de se débarrasser du dénaturant et pour cela nous l'avons dialysé progressivement. Malheureusement la protéine solubilisée par l'urée 8M a précipité lorsqu'elle s'est retrouvée dans une solution qui contenait environ 2M d'urée. Comment faire pour maintenir la protéine soluble et sans dénaturant, deux conditions nécessaires pour réussir sa purification ultérieure sur résine d'amylose ? Schein (1990) a proposé un grand nombre de composés qui ont comme propriété de stabiliser les protéines en solution aqueuse. Nous en avons choisi au moins un parmi chaque groupe proposé (glycérol 10%, glycérol 40%, glucose 10%, glucose 40%, glycine 500mM, betaine 500mM, PEG 1%, PEG 10% et Hydrochlorure de guanidine 0.6M) et nous les avons utilisés aux concentrations indiquées pour diluer dix fois l'extrait 8M urée. Nous avons voulu ainsi vérifier la solubilité de la protéine mais aussi l'efficacité de la purification sur colonne d'amylose de notre protéine présente dans une solution contenant une faible concentration d'urée (0.8M) plus la concentration du cosoluté, deux additifs non recommandés par le fabricant de la colonne d'amylose (voir figure # 15). Les tests préliminaires ont indiqué que l'ajout de glycérol 10%, glucose 40%, glycine 500mM est très efficace pour empêcher la protéine de précipiter mais aussi qu'ils sont compatibles avec la résine d'amylose et permettent ainsi la purification de notre protéine. Par contre, l'ajout de betaine, de PEG ou de guanidine s'est révélé moins efficace à accomplir ces deux fonctions. Ces mêmes tests, à plus grande échelle, ont démontré que la glycine et le PEG (1%) étaient les composés les plus propices à résoudre nos problèmes de solubilité et de purification puisqu'ils ont permis de purifier environ 600 µg de la protéine MOMP de *C. trachomatis* (voir figure # 16). Nous avons choisi d'utiliser la glycine comme additif pour la purification de nos protéines en supposant qu'elle ne nuirait pas aux

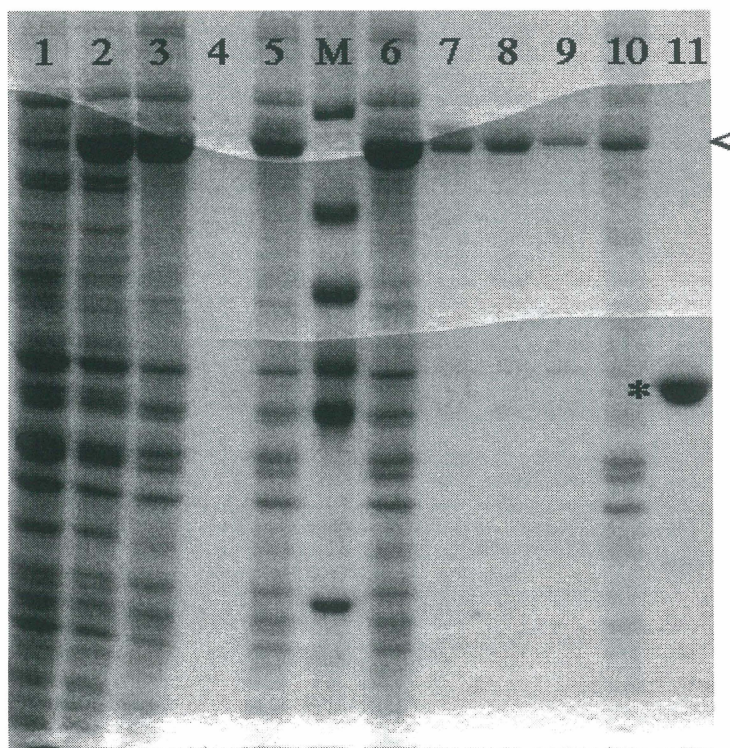


Figure # 15 : Recherche de composés pour maintenir la solubilité de la protéine MOMP de *C. trachomatis* après dialyse.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction.

Piste 3 : Extrait urée dilué dans le glycérol 10 %

Piste 4 : Extrait urée dilué dans le glucose 10 %.

Piste 5 : Extrait urée dilué dans le glucose 40 %.

Piste 6 : Extrait urée dilué dans la glycine 500mM.

Piste 7 : Extrait urée dilué dans la betaine 500mM.

Piste 8 : Extrait urée dilué dans le PEG 1 %.

Piste 9 : Extrait urée dilué dans le PEG 10 %.

Piste 10 : Extrait urée dilué dans la guanidine 0.6M.

* : MBP (\approx 40Kda).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (\approx 80Kda).

M : Marqueur de poids moléculaire en kDa.

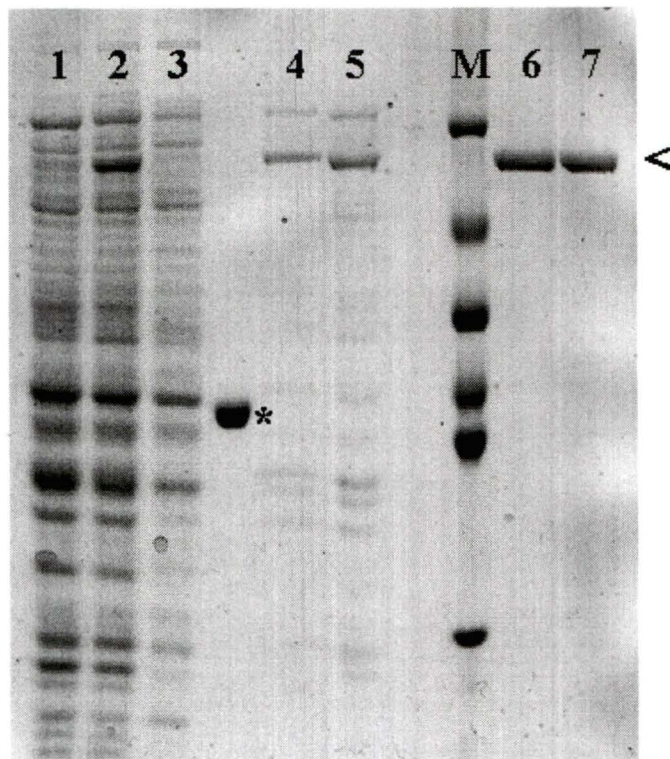


Figure # 16 : Efficacité du PEG et de la glycine à maintenir soluble la protéine MOMP de *C. trachomatis* sans en compromettre la purification sur colonne d'amylose.

Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction du vecteur pMALc₂ transformé dans les AD494

Piste 3 : Extrait brut.

Piste 4 : Matériel non adsorbé sur la colonne de purification de MOMP de *C. trachomatis* en présence de glycine 500mM.

Piste 5 : Matériel non adsorbé sur la colonne de purification de MOMP de *C. trachomatis* en présence de PEG 1 %.

Piste 6 : MOMP de *C. trachomatis* purifiée en présence de glycine 500mM.

Piste 7 : MOMP de *C. trachomatis* purifiée en présence de PEG 1 %.

* : MBP (≈ 40KDa).

▶ : Protéine fusion MOMP de *C. trachomatis* plus la MBP (≈ 80KDa).

M : Marqueur de poids moléculaire en kDa.

manipulations suivantes; c'est-à-dire à la liaison des protéines aux plaques. En suivant exactement la même procédure nous avons obtenu 180 µg de la protéine MOMP de *C. pneumoniae* (voir figure # 17), 1 mg de la protéine MOMP de *C. psittaci* (voir figure # 18), 560 µg du peptide CHLAM HS1 et 270 µg du peptide CHLAM HS2 (voir figure # 17).

Il est important de mentionner que toutes les solutions utilisées pour purifier les protéines devaient contenir de l'urée 0.8M et de la glycine 500mM pour empêcher en tout temps la précipitation de nos protéines.

Comme pour la purification de la protéine MOMP et des peptides CHLAM HS, il a fallu d'abord réduire la concentration de l'urée qui nuit à la colonne d'amylose avant d'entreprendre la purification des CrP60. Suite à la dialyse, on a remarqué qu'il se formait un précipité sauf que la CrP60, contrairement aux autres protéines, ne faisait pas partie des protéines qui précipitaient puisque lorsqu'on a centrifugé l'extrait dialysé, la CrP60 restait dans le surnageant. Nous avons par la suite tenté de purifier sur colonne cette protéine qui se trouvait dans le surnageant, mais nous n'avons jamais obtenu une quantité mesurable de protéines.

3.3 Optimisation des paramètres de l'épreuve ELISA

Pour réaliser un test ELISA, il faut d'abord optimiser un certain nombre de paramètres tels que la quantité de protéine à coupler dans les puits de la plaque, le blocage de la plaque, la dilution à laquelle les sérums vont être utilisés ainsi que la dilution de l'anticorps conjugué.

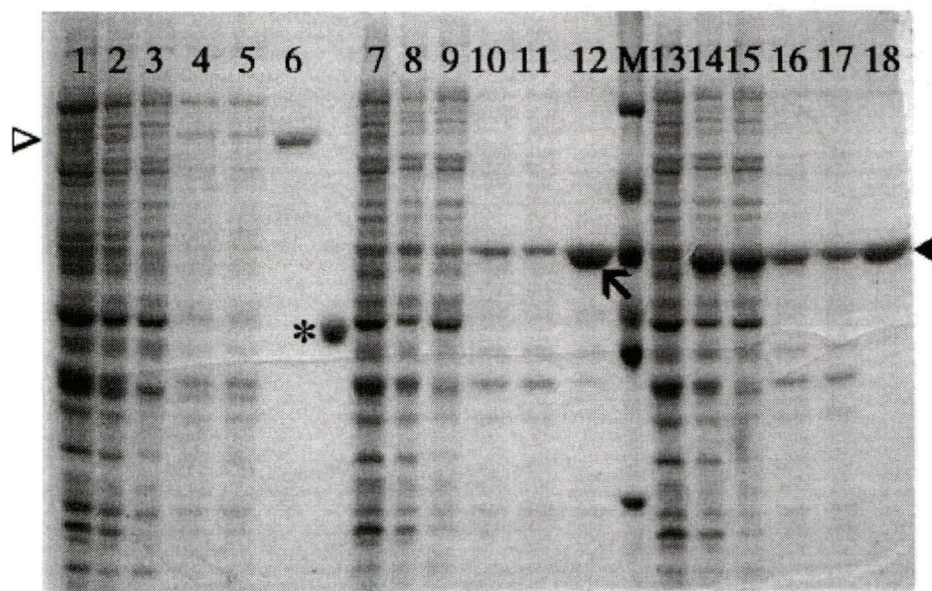


Figure # 17 : Purification sur colonne de la protéine MOMP de *C. pneumoniae* ainsi que des oligopeptides CHLAM HS1 et CHLAM HS2 exprimés par le vecteur pMALC₂.

Pistes (1, 7 et 13) : Protéines totales de la bactérie avant induction.

Pistes (2, 8 et 14) : Protéines totales de la bactérie après induction.

Pistes (3, 9 et 15) : Extrait brut.

Pistes (4, 10 et 16) : Extrait urée dilué avec 500mM glycine.

Pistes (5, 11 et 17) : Matériel non fixé à la colonne.

Pistes (6, 12 et 18) : Protéine purifiée sur colonne.

Pistes (1, 2, 3, 4, 5 et 6) : Protéine MOMP de *C. pneumoniae* exprimée par pMALC₂ introduit dans les bactéries AD494.

Pistes (7, 8, 9, 10, 11 et 12) : Peptide CHLAM HS1 exprimé par pMALC₂ introduit dans les bactéries DH5 α .

Pistes (13, 14, 15, 16, 17 et 18) : Peptide CHLAM HS2 exprimé par pMALC₂ introduit dans les bactéries DH5 α .

* : MBP (\approx 40Kda).

► : Protéine fusion MOMP de *C. pneumoniae* plus la MBP (\approx 80Kda).

◄ : Peptide CHLAM HS1 plus la MBP (\approx 50Kda).

▷ : Peptide CHLAM HS2 plus la MBP (\approx 50Kda).

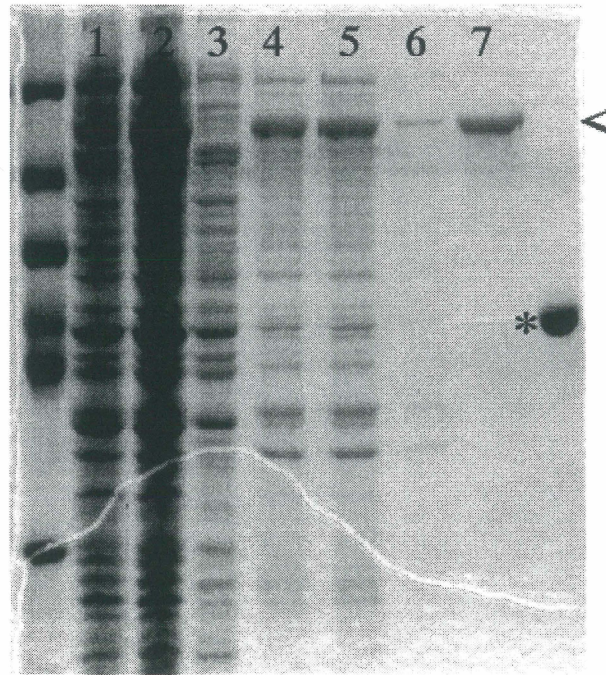


Figure # 18 : Purification sur colonne de la protéine MOMP de *C. psittaci* exprimée par le vecteur pMALc₂ dans les bactéries AD494.

- Piste 1 : Protéines totales de la bactérie avant induction.
- Piste 2 : Protéines totales de la bactérie après induction.
- Piste 3 : Extrait brut.
- Piste 4 : Matière insoluble.
- Piste 5 : Extrait urée dilué avec de la glycine 500mM.
- Piste 6 : Matériels non adsorbés sur la colonne.
- Piste 7: Protéine MOMP de *C. psittaci* purifiée sur colonne d'amylose.
- * : MBP (≈ 40KDa).
- ▶ : Protéine fusion MOMP de *C. psittaci* plus la MBP (≈80KDa).

Nous avons voulu déterminer d'abord la substance qui permettait un meilleur blocage de la plaque en éliminant les réactions non spécifiques. L'étape de blocage est primordiale car elle détermine la spécificité et la sensibilité des résultats obtenus. Les protéines les plus utilisées à cet effet sont la BSA et le lait alors que le détergent le plus utilisé est le Tween 20. Nous avons donc combiné ces deux protéines au Tween 20 et nous avons vérifié leur efficacité sur la plaque. Des résultats très satisfaisants ont été obtenus avec la BSA 3% et le Tween 20 0.2 %. Par la suite nous avons entrepris de déterminer la concentration de protéine que l'on devait lier à la plaque ainsi que la dilution du sérum qui permettrait une meilleure détection. Nous avons donc réalisé un échiquier où nous avons fait réagir différentes quantités de la protéine MOMP de *C. trachomatis* (300ng, 75ng, 37ng et 19ng) avec un sérum *C. trachomatis* positif dilué 100, 300, 1000 et 3000 fois. Nous avons pu en déduire que 75ng de protéine par puits mis en présence d'un sérum dilué entre 100 et 300 fois donnait des valeurs acceptables pour un échantillon positif (voir tableau # 1). Le dernier paramètre qu'il a fallu déterminer est la concentration de l'anticorps conjugué à la peroxydase. Une série de dilutions ont été testées (1/5000, 1/20000, 1/50000, 1/100000, 1/200000 et 1/300000) et la meilleure fut 1/100000 (voir tableau # 2).

Nous avons décidé d'utiliser la MBP comme témoin négatif pour s'assurer d'abord que les sérums ne réagissaient pas avec la partie MBP de nos protéines fusion liées à la plaque. Nous avons produit nous-mêmes la MBP en purifiant sur colonne l'extrait brut des bactéries AD494 transformées avec le vecteur pMALc₂ car la MBP y est soluble. Cette protéine étant produite dans les mêmes conditions que nos protéines de *Chlamydia* est donc plus représentative des réactions non spécifiques qui pourraient avoir lieu avec des protéines contaminantes que si l'on avait utilisé une MBP commerciale extrêmement pure. En plus d'être notre témoin négatif, elle nous a servi à déterminer la valeur seuil nous permettant de considérer un sérum comme étant positif. Nous

Dilution Sérum	Quantité de MOMP de <i>C. trachomatis</i> (ng)			
	300	75	37	19
Anti-CT				
1/100	2.5	1.501	1.136	0.913
1/300	0.903	0.586	0.422	0.331
1/1000	0.343	0.207	0.135	0.107
1/3000	0.110	0.071	0.047	0.067

Tableau # 1 : Échiquier pour déterminer la quantité de protéine à fixer sur la plaque et la dilution du sérum.

Différentes quantités de protéine fusion MOMP de *C. trachomatis*-MBP furent adsorbées dans les puits d'une plaque à microtitration. Après blocage, différentes dilutions d'un sérum contenant des anticorps anti-*C. trachomatis* furent incubées dans les puits. Les anticorps sont détectés à la suite d'une réaction avec la protéine G couplée à la peroxydase diluée 5000 fois (on l'a utilisée comme second anticorps avant de recevoir l'anti-IgG humain couplé à peroxydase) et d'une incubation avec le TMB et lecture de la coloration à 450nm.

Dilution de l'anti-IgG	Quantité de protéines (75ng)		
	MPBc	MBPr	MOMP L2
1/5000	1.746	2.5	2.5
1/20000	1.787	2.5	2.5
1/50000	0.821	2.5	2.5
1/100000	0.508	1.934	2.493
1/200000	0.236	0.974	0.979
1/300000	0.169	0.629	0.664

Tableau # 2 : Détermination de la concentration de l'anti-IgG humain couplé à la peroxydase à utiliser pour le test ELISA.

Le test ELISA a été effectué avec le sérum anti-CT dilué 1/100.

Absorbances obtenues suite à la réaction de la peroxydase couplée à l'anti-IgG humain avec le TMB et lecture de la coloration à 450nm.

MBPc : Maltose binding protein commerciale.

MBPr : Maltose binding protein recombinante.

MOMP L2 : MOMP de *C. trachomatis*.

avons décidé qu'un sérum ne pourrait être déclaré positif pour l'une de nos protéines de *Chlamydia* que si l'absorbance obtenue était 2 fois plus élevée que celle de la MBP recombinante.

Nous avons pu alors entreprendre de détecter la présence d'anticorps anti-*Chlamydia* chez une série de patients dont les prélèvements urogénitaux ont été testés positifs ou négatifs par PCR pour la présence de *C. trachomatis* mais aussi sur une série de sérums de patients trouvés positifs par MIF pour *C. pneumoniae*. Nous avons de cette façon découvert que certains sérums de patients réagissaient fortement avec la MBP recombinante (voir tableau # 3). Cette réaction été toutefois moindre avec la MBP commerciale ce qui indiquait que les réactions positives enregistrées étaient dues à des protéines contaminantes présentes dans la préparation de MBP et probablement dans nos protéines purifiées de *Chlamydia*. Les antigènes de surface obtenus pour les trois *Chlamydia* malgré leur purification sur colonne, contenaient encore une certaine quantité de protéines contaminantes de *E. coli*. Pour faire en sorte que ces protéines n'interfèrent pas lors de notre test ELISA et nous empêchaient de confirmer avec certitude la sérologie anti-*Chlamydia* des patients, nous avons envisagé comme première stratégie de faire une seconde purification directement sur la plaque préalablement couplée avec de la dextrine comme cela a été proposé par Felleisen et al. (1996). La dextrine retient la MBP de la protéine fusion tandis que des lavages éliminent les protéines contaminantes et il ne reste alors que la protéine d'intérêt fusionnée à la MBP. Nous avons suivi leur protocole pour lier nos protéines à la plaque et pour éliminer les protéines contaminantes puis nous avons réalisé un test ELISA conventionnel sur cette même plaque. Aucune expérience utilisant la dextrine n'a donné des résultats concluants qui prouvaient que la dextrine s'est liée à la plaque ou que nos protéines sont liées à la dextrine. Vu ces résultats, on a décidé de tenter la stratégie classique utilisée lorsqu'un problème de non

Sérums utilisés (1/100)	Quantité de protéines (75ng)		
	MBPc	MBPr	MOMP L2
Anti-CT	0.187	1.346	2.035
27000	0.371	1.906	1.153
26970	0.227	0.989	0.300
26964	0.085	0.152	0.263
26959	0.395	0.248	0.124

Tableau # 3 : Vérification de l'efficacité de notre test ELISA sur une série de sérum de patients dont les prélèvement urogénitaux ont été testés négatifs pour *C. trachomatis* par PCR.

Absorbances obtenues suite à la réaction de la peroxydase couplée à l'anti-IgG humain avec le TMB et lecture de la coloration à 450nm.

Sérum anti-CT : sérum d'un patient dont le prélèvement urogénitaux a été testé positif pour *C. trachomatis* par PCR.

27000, 26970, 26964 et 26959 : sérums de patients dont les prélèvement urogénitaux ont été testés négatifs par PCR.

MBPc : Maltose binding protein commerciale.

MBPr : Maltose binding protein recombinante.

MOMP L2 : MOMP de *C. trachomatis*.

spécificité se présente, c'est-à-dire d'adsorber les sérums avec les protéines totales de *E. coli* (préparées de la même façon que les protéines MOMP et les peptides CHLAM HS) avant de les mettre en présence des protéines couplées à la plaque. Lorsqu'on a adsorbé le sérum pendant 1 heure puis qu'on l'a centrifugé 10 minutes avant de le déposer dans les puits, on a réussi à éliminer plus du tiers de la réaction non spécifique qui a lieu avec la MPB recombinante (voir tableau # 4).

Ayant réussi à diminuer les réactions non spécifiques, nous avons repris la détection des anticorps anti-*Chlamydia* sur la série de sérums accumulées. Nous avons d'abord utilisé les quelques patients chez qui on n'a pas trouvé du *C. trachomatis* au niveau urogénital par PCR pour vérifier la validité de notre ELISA. Ils ont tous donné une réaction négative vis-à-vis de la MOMP de *C. trachomatis*. La sérologie venait confirmer les résultats du PCR. Cependant les sérums de patients trouvés positifs pour *C. pneumoniae* par MIF ont donné pour la plupart des réactions négatives avec la MOMP de *C. pneumoniae* de notre test ELISA.

Nous avons pensé que la dénaturation de la protéine MOMP de *C. pneumoniae*, nécessaire à sa solubilisation et à sa purification, à peut être inactivé les épitopes conformationnels qui réagissent avec les anticorps humains. Nous avons donc voulu savoir comment ces mêmes sérums réagiraient en présence de la protéine MOMP renaturée de *C. pneumoniae*. Il nous fallait réussir à renaturer la protéine et à lui redonner sa conformation originale. La protéine disulfide isomérase (PDI) permet la renaturation de la ribonucléase et de l'insuline en facilitant l'isomérisation des ponts disulfures jusqu'à ce que une conformation stable soit obtenue, ce qui représente, probablement, la conformation native. Nous avons traité nos protéines d'intérêt avec une faible quantité d'agents réducteurs et la PDI dans l'espoir qu'ils brisent les ponts disulfures fautifs et que le temps d'incubation permette la formation des bons ponts disulfures.

Sérums utilisés (1/100)	Quantité de protéines (75ng /puits)					
	Sérums non adsorbés			Sérums adsorbés		
	MBPc	MPBr	MOMP L2	MBPc	MPBr	MOMP L2
Anti-CT	0.168	0.377	0.551	0.235	0.199	0.545
27000	0.147	0.997	0.920	0.103	0.286	0.229
26964	0.152	0.354	0.206	0.168	0.277	0.314

Tableau # 4 : Comparaison entre un test ELISA réalisé avec des sérums non adsorbés versus des sérums adsorbés par les extraits de *E. coli*.

Absorbances obtenues suite à la réaction de la peroxydase couplée à l'anti-IgG humain avec le TMB et lecture de la coloration à 450nm.

Sérum anti-CT : sérum d'un patient dont le prélèvement urogénital a été testé positif pour *C. trachomatis* par PCR.

27000 et 26964: sérums de patients dont les prélèvements urogénitaux ont été testés négatifs par PCR.

MBPc : Maltose binding protein commerciale.

MPBr : Maltose binding protein recombinante.

MOMP L2 : MOMP de *C. trachomatis*.

Nous avons commencé par suivre les directives de PIERCE, une compagnie qui commercialise la PDI. On a renaturé la protéine MOMP de *C. pneumoniae* dans un tampon phosphate (100mM à pH 7.5) en présence de glutathione 0.2mM (agent réducteur) et d'une même quantité de PDI que de la protéine à renaturer. On a incubé une heure à température ambiante puis on a déposé dans les puits d'une plaque et un test ELISA a été effectué avec les sérums ayant des anticorps anti-*Chlamydia pneumoniae* détectés par MIF. Ces sérums qui donnaient une réaction négative avec la MOMP de *C. pneumoniae* dénaturée réagissent fortement, non pas parce qu'ils contenaient des anticorps qui reconnaissaient la protéine renaturée mais plutôt parce qu'ils contenaient des anticorps qui reconnaissaient la PDI. Pour remédier à ceci nous avons décidé de renaturer la protéine MOMP une fois couplée à la plaque et d'effectuer plusieurs lavages après cette étape pour s'assurer d'éliminer la totalité de la PDI. Lors de ce test nous avons également varié la concentration de glutathione (10 μ M et 1 μ M), nous avons essayé un autre agent réducteur le DTT (10 μ M et 1 μ M) et nous avons aussi vérifié l'effet de ces agents réducteurs seuls, sans le concours de la PDI sur le repliement de la protéine. Malheureusement aucune des conditions de renaturation envisagée n'a donné de résultat positif : aucun des sérums n'a réagit avec la protéine MOMP de *C. pneumoniae* supposée renaturée.

3.4 Analyse de sérums humains :

Nous avons récolté des sérums de patients quelques temps après que ces derniers furent dépistés par PCR pour *C. trachomatis* dans des prélèvements de l'endocol ou de l'urètre. Une série de 33

patients diagnostiqués porteurs de *C. trachomatis* et une série de 33 patients négatifs pour cette bactérie ont été testés grâce à notre ELISA. Nous avons vérifié la réaction de ces patients avec la protéine MOMP de *C. trachomatis* mais aussi avec les deux autres protéine MOMP et les deux épitopes HS1 et HS2. Avec la MOMP de *C. trachomatis*, nous avons trouvé positif par ELISA 48% des patients positifs pour *C. trachomatis* versus 6% des patients négatifs. A première vue le test nous a semblé peu sensible pour détecter une infection malgré le fait qu'il employait la protéine immunodominante de la bactérie. En analysant les résultats selon le délai entre la détection de *C. trachomatis* et la prise du sang, nous avons constaté que 71% des patients dont les sérums furent prélevés entre un mois et un an après la détection de *C. trachomatis* réagissaient fortement avec la MOMP de *C. trachomatis*. Parmi les patients négatifs pour *C. trachomatis* nous avons retrouvé 6% de positivité avec notre test ELISA. Lorsqu'on a fait réagir ces mêmes patients avec la MOMP de *C. pneumoniae* dénaturée, on a obtenu 17% de réaction positive dans le cas des patients infectés par *C. trachomatis* et 6% dans le cas des patients sains (voir tableau # 5 et # 6). Par contre, aucun des 66 patients ne réagit avec la MOMP de *C. psittaci*, l'épitope HS1 et l'épitope HS2. Nous avons choisi une série de patients qui avaient plus de 65 ans et donc qui ont sûrement eu une infection pulmonaire à *C. pneumoniae* et nous les avons testés par MIF pour rechercher la présence d'anticorps anti-*C. pneumoniae*. Nous en avons trouvé 11 positifs. Nous avons fait réagir le sérum de ces patients avec la protéine MOMP de *C. pneumoniae* dénaturée, et seulement deux patients ont réagi avec la protéine. Le 17% de positivité qu'on a eu sur les sérums jugés réactifs par MIF nous a indiqué que notre test ELISA n'est pas efficace pour détecter les anticorps anti-*C. pneumoniae*. On n'a pas jugé nécessaire de tester nos patients qui ont subi une chirurgie cardio-vasculaire vu la sensibilité faible du test.

Patients	Sexe	Délai entre sérologie et diagnostic	Réaction avec MOMP L2	Réaction avec MOMP pneu
1	F	3 fois en 98/99	+	+
2	F	Même temps	-	-
3			-	-
4	F	2 semaines	-	-
5	F	3 jours	-	-
6	F	1 an	+	-
7	M	11 mois	-	+
8	M	2 mois	+	+
9	F	6 ans	-	-
10	F	3 semaines	-	-
11	F	4 mois	+	+
12	F	3 ans	-	-
13	F	1 et 2 mois	IND	IND
14	F	3 fois en 98	+	-
15	F	16 mois	-	-
16	M	15 mois	-	-
17	F	8 mois	+	-
18	F	2 semaines	+	-
19	F	6 mois	+	+
20	F	1 an	+	-
21	F	11 mois	-	-
22	M	6 ans	-	-
23	F	5 ans	-	-
24	F	4 ans	-	-
25	M	Même temps	+	-
26	F	4 ans	-	-
27	F	6 mois	IND	IND
28	F	5 ans	+	-
29	M	1ans	-	-
30		5 mois	-	-
31	F	1ans	+	-
32	F	2 semaines	+	-
Anti-CT	F	4 mois	+	-

Tableau # 5 : Compilation des résultats sérologiques obtenus par notre test ELISA pour les patients dont le prélèvement urogénital a été testé positifs pour *C. trachomatis*.

MOMP L2 : MOMP de *C. trachomatis*.

MOMP pneu : MOMP de *C. pneumoniae*.

IND : indéterminé (brut de fond trop élevé).

Patients	Age (ans)	Réaction avec la MOMP L2	Réaction avec la MOMP pneu
1	27	-	-
2	19	-	-
3	18	-	-
4	22	-	-
5	19	-	+
6	23	-	-
7	17	-	-
8	19	-	-
9	20	-	-
10	20	-	-
11	26	-	-
12	19	-	-
13	19	-	-
14	14	+	-
15	19	+	-
16	27	-	-
17	14	-	-
18	20	-	-
19	17	-	-
20	25	IND	IND
21	21	-	-
22	27	-	-
23	17	-	-
24	20	-	-
25	20	-	-
26	27	-	-
27	24	-	-
28	17	-	-
29	17	-	-
30	18	-	-
31	17	-	-
32	21	-	+
33	21	-	-

Tableau #6 : Compilation des résultats sérologiques obtenus par notre test ELISA pour les patients dont le prélèvement urogénital a été testé négatif pour *C. trachomatis*.

MOMP L2 : MOMP de *C. trachomatis*.

MOMP pneu : MOMP de *C. pneumoniae*.

IND : indéterminé (brut de fond trop élevé).

3.5 Recherche de *C. pneumoniae* dans les biopsies de tissu artériels et dans les cellules du sang :

Chez les patients ayant un anévrisme de l'aorte qui devait être réséqué, les chirurgiens vasculaires nous ont fourni un spécimen de l'anévrisme qu'ils ont enlevé et qui comporte des évidences athérosclérotiques ainsi qu'un échantillon de sang dont la partie sérum était utilisée pour le test ELISA et la portion cellules pour la recherche par PCR de *C. pneumoniae*. Le résultat de ces trois tests pourrait apporter des nouvelles preuves ou confirmer la théorie qui veut que *C. pneumoniae* soit impliquée dans l'athérosclérose. Nous avons donc reçu 26 biopsies d'artères que nous avons découpés en petits morceaux d'environ 5mm et 22 échantillons de sang que nous avons séparés en sérum et cellules.

Le PCR est la méthode de choix pour rechercher la présence d'un micro-organisme, même quand il est en faible quantité, dans les tissus ou dans le sang. Nous avons donc décidé d'amplifier des fragments d'ADN spécifiques à *C. pneumoniae*. Dans notre laboratoire on a mis au point un PCR qui utilise les amorces cpnA et cpnB (Gaydos et al., 1992) et qui amplifie le gène de l'ARN ribosomal 16S pour rechercher la présence de *C. pneumoniae* dans les sécrétions respiratoires et on a même produit un témoin positif « pUC rDNA court » (Mengue Metogho et al., 1999). Ce vecteur plasmidique porte un fragment de 465pb du gène codant pour l'ARN ribosomal amplifié par les amorces cpnA et cpnB qui a été raccourci en enlevant un fragment de 62 pb libéré par les enzymes HpaI et BsaAI. Lors de l'amplification par PCR de matériel provenant de patient, on a ajouté à la préparation le vecteur « pUC rDNA court ». Étant donné qu'il est plus court que le fragment d'ADN ribosomal qui pourrait exister chez les patients, il est facilement identifiable et

il nous a permis de déterminer si le PCR a bien marché, si la préparation contenait des inhibiteurs et même de quantifier de façon approximative l'ADN chlamydien présent dans le spécimen de patient.

Les conditions d'un PCR qui emploie les amorces cpnA et cpnB étant connues, il nous fallait trouver une méthode pour extraire l'ADN des tissus et du sang fournis par les chirurgiens. Nous avons donc expérimenté six différentes méthodes (décrites au paragraphe 2.6) pour les tissus et cinq méthodes pour récupérer l'ADN du sang (décrites au paragraphe 2.5) dans le but de trouver celle qui serait la meilleure du point de vue extraction de l'ADN mais aussi la meilleure pour éliminer les inhibiteurs éventuels du PCR. Pour évaluer l'efficacité de ces méthodes, on a utilisé un spécimen de patient auquel on a ajouté une quantité déterminée de bactéries *E. coli* qui portaient le vecteur « pUC rDNA court ». On a extrait l'ADN en suivant les protocoles décrits puis on a fait un PCR avec les amorces cpnA et cpnB.

La méthode qui a réuni les deux critères énoncés plus haut lors de l'extraction de l'ADN des tissus a été celle qui utilise le STM plus un traitement à la protéinase K (voir figure # 19). On a donc entrepris d'extraire l'ADN de nos biopsies par cette méthode et de réaliser ensuite le PCR sur l'extrait obtenu. La plupart des spécimens se sont révélés contenir des inhibiteurs (18/26). On a alors diminué la quantité d'extrait mis dans le PCR de un dixième volume de l'extrait total à un centième volume et nous avons ainsi éliminé le problème des inhibiteurs mais nous avons aussi diminué nos chances de détecter la présence de *C. pneumoniae* surtout si elle est présente en très faible quantité. Le PCR effectué avec les nouveaux paramètres, a indiqué qu'aucun de nos patients ne présente de bande à 465pb correspondant à l'amplification de l'ARN ribosomal de *C. pneumoniae*.

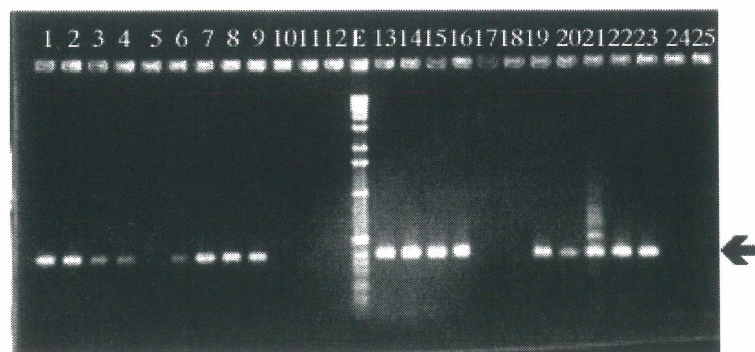


Figure # 19 : Comparaison de l'efficacité des méthodes d'extraction employées pour récupérer l'ADN des biopsies d'artères présentant des lésions athérosclérotiques.

Toutes les pistes contiennent l'extrait d'ADN de la biopsie à laquelle ont été ajoutées 10 bactéries portant le pUC rDNA court.

Les pistes paires contiennent en plus, des 10 bactéries portant le pUC rDNA court ajoutées avant le PCR.

Pistes (1 et 2) : Extraction par la matrice BioRad.

Pistes (3 et 4) : Extraction grâce à la trousse Qiagen.

Pistes (5 et 6) : Extraction grâce à la trousse Puregene.

Pistes (7 et 21) : 10 bactéries portant le pUC rDNA court.

Pistes (8 et 22) : 1 bactérie portant le pUC rDNA court.

Pistes (9 et 23) : 0.1 bactérie portant le pUC rDNA court

Pistes (10, 11, 12, 24 et 25) : H₂O.

Pistes (13 et 14) : Extraction au STM et protéinase K.

Pistes (15 et 16) : Extraction par billes de verre dans du STM.

Pistes (17 et 18) : Extraction par billes de verre dans le tampon Moazed et al.(1997).

Pistes (19 et 20) : Extraction par billes de verre dans le tampon Moazed et al. sans l'étape de l'extraction au CTAB

E : Echelle de poids moléculaire (pb).

La méthode sélectionnée pour l'extraction de l'ADN à partir du sang et qui a répondu à nos exigences est la modification du protocole de Moazed et al. (1997) décrite au paragraphe 2.5 (voir figure # 20). Les 22 échantillons de sang ont donc subi ce traitement et une partie (1/10 du volume final) de l'extrait obtenu a été utilisé pour faire le PCR avec les amorces cpnA et cpnB. Aucun extrait n'était inhibiteur pour le PCR mais aucun patient ne possédait de *C. pneumoniae* dans les cellules de son sang.

Nous avons par la suite décidé de vérifier la présence de *C. pneumoniae* dans les tissus et dans le sang par l'amplification de fragments d'ADN à l'aide de PCR niché ou semi-niché qui requièrent deux rondes d'amplification successives et qui par conséquent améliorent la détection de l'ADN présent en très faible proportion. Le gène *omp1*, le gène de l'ARN ribosomal 16S de même que le gène inconnu de Campbell, ont été visés comme cibles pour ces PCR et nous n'avons détecté la présence d'aucun de ces gènes dans les extraits des 26 biopsies et des 22 échantillons de sang. Dernièrement, Nyström-Rosander et al. (1997) ont utilisé deux amorces cpn1 et cpn2, qui amplifient un fragment du gène de l'ARN ribosomal 16S à l'intérieur de la séquence produite par cpnA et cpnB, en PCR niché. Dans 19 des valves aortiques sur les 39 testées, ils ont découvert du *C. pneumoniae*. Nous avons donc testé ces amorces et nous avons découvert qu'elles étaient extrêmement efficaces tout au moins sur le vecteur «pUC rDNA court » ce qui nous a fortement encouragé à les essayer sur nos extraits. Encore une fois, le résultat fut négatif. En conclusion aucun des anévrismes de l'aorte et aucun sang appartenant à des patients atteints d'athérosclérose ne contenait la bactérie *C. pneumoniae*.

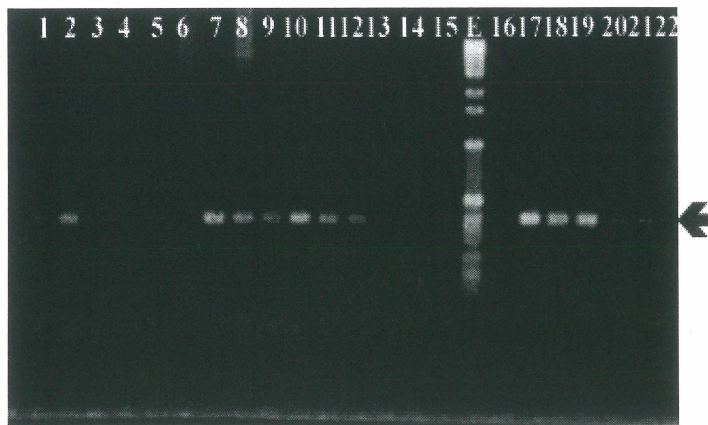


Figure # 20 : Comparaison de l'efficacité des méthodes d'extraction employées pour récupérer l'ADN des cellules du sang des patients qui ont subi une chirurgie vasculaire.

Les pistes 1, 3, 5 et 7 contiennent l'extrait d'ADN obtenu suite à l'extraction du culot de sang du premier traitement au Tween/NaOH et centrifugation alors que les pistes 2, 4, 6, 8, 9 et 16 contiennent l'extrait d'ADN obtenu suite à l'extraction du culot de sang traité deux fois au Tween /NaOH.

Pistes (1 et 2) : Extraction par la matrice BioRad.

Pistes (3 et 4) : Extraction grâce à la trousse Qiagen.

Pistes (5 et 6) : Extraction par le protocole de Moazed et al.(1997)

Pistes (7 et 8) : Extraction par le protocole de Moazed et al.(PCR en présence de 5Mm $MgCl_2$ supplémentaire).

Pistes 9 : Extraction au NaOH.

Pistes (10 et 17) : 100 bactéries portants le pUC rDNA court.

Pistes (11 et 18) : 10 bactéries portants le pUC rDNA court.

Pistes (12 et 19) : 3 bactéries portants le pUC rDNA court.

Pistes (13, 14, 15, 21 et 22) : H_2O .

Piste 16 : Extraction au STM /diluant.

E : Echelle de poids moléculaire (pb).

4 DISCUSSION :

En septembre dernier, un groupe international de chercheurs s'est réuni pour discuter du rôle éventuel de certains micro-organismes dans le développement des maladies cardio-vasculaires et de l'athérosclérose de plus en plus répandues dans les pays industrialisés. Parmi les organismes les plus soupçonnés d'être impliqués dans le développement de ces maladies se trouve la bactérie *C. pneumoniae*. Tous les chercheurs se sont entendus pour mettre plus d'emphasis dans l'étude de cette bactérie découverte récemment et encore méconnue. Pour atteindre cet objectif, une série de recommandations ont été émises au cours de cette réunion et la deuxième de ces recommandations est de développer des tests sensibles et spécifiques pour le diagnostic de *C. pneumoniae* (O'Connor, 1999)

Le but de notre projet rejoint les idées développées lors de ce symposium : en mettant au point un test ELISA pour détecter les anticorps anti-*C. pneumoniae*, on a essayé de développer un test de diagnostic plus fiable que la microimmunofluorescence, on a tenté d'identifier la protéine immunodominante de *C. pneumoniae* en évaluant la réaction sérologique versus diverses protéines de surface et finalement on a voulu confirmer l'implication de *C. pneumoniae* dans le processus de l'athérosclérose.

Il a été clairement démontré par des tests d'immunofluorescence que *C. pneumoniae* possédait un antigène spécifique à l'espèce et que cet antigène était situé à la surface de la bactérie (Chi et al.,

1987 ; Puolakkainen et al., 1995). Cet antigène, par contre, n'a jamais été identifié définitivement par immuno-buvardage probablement à cause de sa dénaturation. Nous et d'autres (Wang et al, 1991) pensons que cet antigène est probablement la protéine MOMP puisqu'elle est la protéine la plus abondante à la surface de la membrane externe mais aussi parce que pour *C. trachomatis* et *C. psittaci*, les deux autres membres du genre *Chlamydia*, c'est la protéine immunodominante et qui détermine la diversité antigénique. Pour confirmer notre théorie sur la nature de la protéine immunodominante de *C. pneumoniae*, nous avons choisi d'utiliser la protéine MOMP comme antigène pour notre test ELISA ainsi que la protéine CrP60, qui fait partie des protéines de la membrane externe et deux épitopes spécifiques aux *Chlamydia* de la protéine hsp60 puisque se sont les seules protéines constituant la membrane des *Chlamydia* que l'on a caractérisé. Pour s'assurer que les résultats de notre test ELISA sont le fruit d'une réaction entre des anticorps spécifiques à *C. pneumoniae* et les antigènes de cette bactérie et non d'une réaction non spécifique due à des anticorps dirigés contre les deux autres *Chlamydia*, nous avons décidé d'inclure dans notre test ELISA les antigènes MOMP, CrP60 et hsp60 de *C. trachomatis* et *C. psittaci*.

On se devait de produire des grandes quantités de ces protéines, on a donc cloné leurs gènes dans les vecteurs d'expression pMAL. Les gènes ont été induits et les protéines purifiées. Au cours de ces étapes, nous avons découvert que la protéine MOMP et la protéine CrP60 étaient insolubles. En effet, il semblerait que la bactérie *E. coli* DH5 α comme la bactérie *E. coli* AD494 ne sont pas capables de former les innombrables ponts disulfures qui régissent le repliement de ces protéines. Les protéines qu'elles synthétisent se retrouvent dans des corps d'inclusions et le seul moyen de les extraire est d'utiliser des agents dénaturants tel que l'urée. Nous avons également découvert que lorsqu'on élimine l'agent dénaturant, la protéine MOMP ne restait pas en solution et que

pour l'avoir dans un état soluble, il fallait conserver une faible concentration d'urée combinée à de la glycine. Par contre la CrP60 semblait rester soluble malgré l'élimination de l'urée. Les peptides CHLAM HS1 et CHLAM HS2 n'ont pas de ponts disulfures qui pourraient nuire à leur solubilité mais comme les deux autres protéines, ils ont été produits sous forme de corps d'inclusion bien qu'une partie soit restée soluble.

La production de protéines recombinantes en grande quantité est souvent entravée par la formation d'aggrégats cytoplasmiques appelés corps d'inclusion (Marston, 1986). La formation de ces aggrégats résulte de la coprécipitation de la protéine recombinante dénaturée, de ribosomes, d'acides nucléiques ainsi que de protéines cytoplasmiques et membranaires (Hartley et al., 1988). La façon la plus facile de réduire la formation des corps d'inclusion est de diminuer la température d'induction des protéines (Bishai et al., 1987 ; Schein et Noteborn, 1988). Donc la modification des conditions de croissance et d'induction des bactéries est une bonne approche pour résoudre le problème de formation de corps d'inclusion. Blackwell et Horgan (1991) ont montré que l'utilisation du choc osmotique (ajout de sorbitol dans le milieu de croissance) pour permettre l'entrée de betaine dans le cytoplasme favorise la stabilisation de la protéine recombinante et sa solubilité. Nous avons donc tenté ces différentes approches pour obtenir nos protéines solubles avant de se tourner vers le seul moyen d'extraire des protéines emprisonnées dans des corps d'inclusion c'est-à-dire l'utilisation d'agents chaotropiques forts (Marston, 1986). Dans notre cas, la formation de corps d'inclusion n'est probablement pas le seul problème qui empêche la bactérie de produire des protéines solubles. La nature même de nos protéines d'intérêts (c'est à dire des protéines membranaires) pourrait être impliqué dans la formation de protéines insolubles puisque même à l'état naturel dans les *Chlamydia*, elles se retrouvent sous forme insolubles (Caldwell et al., 1981). Les protéines membranaires possèdent des domaines

hydrophobes insérés dans la double couche lipidique et des domaines hydrophiles exposés aux phases aqueuses. Dans le milieu aqueux, la force d'attraction entre les domaines hydrophobes des protéines est considérable, ce qui entraîne leur aggrégation en larges complexes et leur permet de s'insérer dans la membrane lipidique (Neidhardt et al., 1994). La séquence signal de la MBP n'est pas suffisante pour provoquer l'exportation des protéines membranaires de *Chlamydia* dans l'espace périplasmique et donc l'accumulation d'une forte concentration de ces protéines dans le cytoplasme de *E. coli* (milieu hydrophile) provoque leur aggrégation. Comme les protéines de la membrane externe (MOMP et CrP) sont des protéines qui forment naturellement une charpente rigide pour maintenir la structure cellulaire des *Chlamydia*, lorsqu'elles s'assemblent, elles forment un complexe fortement soudé et donc insoluble. L'élimination de la région hydrophobe pourrait être une solution au problème d'insolubilité.

En plus, les protéines membranaires fonctionnent dans un environnement amphiphilique et donc se replient de façon complètement différente des protéines cytoplasmiques : elles retournent leur sites hydrophobes vers l'extérieur au lieu de les retourner vers l'intérieur (Shein, 1990). Les protéines membranaires de *Chlamydia* se retrouvant dans le cytoplasme se replient comme étant des protéines cytoplasmiques et deviennent ainsi insolubles.

L'utilisation de l'urée pour l'extraction de nos protéines et leur purification met en péril la réalisation de notre test ELISA puisque l'on sait que les anticorps produits lors d'une infection à *C. pneumoniae* reconnaissent des épitopes conformationnels. Plusieurs études ont montré que lorsqu'on a fait subir aux antigènes de *C. pneumoniae* des traitements physiques ou chimiques (chaleur, détergents, agents réducteurs et méthanol) plus aucune réaction ne se produisait avec les anticorps spécifiques à l'espèce (Wang et al., 1991 ; Puolakkainen et al., 1995 ; Christiansen et al., 1997). Nous avons décidé d'initier notre projet en utilisant la protéine MOMP de *C.*

trachomatis pour mettre au point le test ELISA puisque les anticorps produits contre la protéine MOMP de cette bactérie reconnaissent des épitopes linéaires qui ne sont nullement affectés par la dénaturation. Ce test a montré que 48% des patients testés positifs par PCR pour *C. trachomatis* possédaient des anticorps anti-MOMP de *C. trachomatis*. Si l'on regroupe ces patients selon l'intervalle entre la détection de *C. trachomatis* et la prise de sang pour la sérologie, 71% des patients ayant subi un prélèvement de un à douze mois après l'infection réagissaient avec la protéine MOMP de *C. trachomatis* et étaient donc déclarés positifs par notre test ELISA. Ces résultats concordent avec d'autres études sérologique de *C. trachomatis*. Lors d'une infection avec cette bactérie les anticorps MIF apparaissent après au moins quatre semaines (Black, 1997) tout comme pour *C. pneumoniae* (Kuo et al., 1995) et si la maladie est détectée à son début et qu'elle est traitée il n'y a probablement pas de production d'anticorps puisque les MTS sont des infections superficielles.

Le groupe de Theunissen (1993) a mis au point un test ELISA qui utilise comme antigène des CE de *C. trachomatis* serovars L2, F, E, H, I et J. Ils voulaient ainsi s'assurer de détecter les infections urogénitales provoquées par *C. trachomatis* quelque soit le serovar impliqué. Les résultats qu'ils ont obtenus sont très similaires aux nôtres : 49% des hommes dont la culture est positive pour *C. trachomatis* possèdent des IgG dirigés contre les CE de *C. trachomatis* et 73% des femmes dont la culture est positive présentent des anticorps anti-*C. trachomatis*. Lorsqu'on regroupe nos patients dont le prélèvement urogénital est positif par PCR selon leur sexe, on détecte des IgG chez 81% des femmes et chez 33% des hommes grâce à notre test ELISA. Le test ELISA réalisé par l'équipe de Theunissen qui utilise des CE de six serovars différents ainsi que la panoplie de tests ELISA disponibles sur le marché et qui utilisent des CE de *C. trachomatis* serovar L2, détectent des anticorps qui réagissent avec l'antigène spécifique au genre soit les LPS

(Black, 1997). Les anticorps détectés par ces tests sont très spécifiques au genre mais pas à l'espèce, en effet une étude anglaise a montré que les IgG sont dirigés contre *C. pneumoniae* et *C. psittaci* chez plus de la moitié des patients ayant une MTS (Moss et al., 1993). Les résultats statistiques obtenus par les deux tests se ressemblent mais notre test est assurément plus spécifique puisque nous n'avons utilisé que la protéine MOMP de *C. trachomatis*, antigène spécifique à l'espèce. Les chiffres obtenus par Theunissen comptabilisent des réactions qui détectent des anticorps anti-*C. trachomatis* mais aussi des réactions qui détectent des anticorps anti-*C. pneumoniae* et *C. psittaci* alors que nos chiffres ne comptabilisent que des réactions qui révèlent la présence d'anticorps anti-*C. trachomatis*.

Il a été démontré que la protéine hsp60 est impliquée dans la réaction immunologique qui engendre des séquelles qui surviennent suite à une infection causée par *C. trachomatis* (Peeling et Brunham, 1996). Brunham et al. (1995) ont montré que 84% des femmes séropositives pour *C. trachomatis* et ayant une infertilité possédaient des anticorps anti-hsp60 par contre seulement 33% des femmes séropositives ayant une salpingite avaient des anticorps anti-hsp60. Ils en ont conclu que l'on retrouve des anticorps anti-hsp60 plus fréquemment parmi les patientes ayant des séquelles immunologiques que parmi celles qui sont seulement positives par MIF. Une association entre la présence d'anticorps anti-hsp60 de *C. trachomatis* et les salpingites (Wagar et al., 1990 ; Pelling et al., 1997 ; Domeika et al., 1998), l'infertilité (Toye et al., 1993), les grossesses ectopiques (Brunham et al., 1992), le trachome (Morrison et al., 1989) a également été démontrée par immuno-buvardage puis par des tests ELISA qui utilisent la protéine hsp60 recombinante comme antigène ou des épitopes spécifiques de la protéine.

Parmi tous les sérums que nous avons analysés avec notre test ELISA, aucun ne nous a permis de détecter des réactions avec les épitopes spécifiques aux *Chlamydia* de la protéine hsp60.

L'absence totale de réaction a été inattendue particulièrement avec l'oligopeptide CHLAM HS2 qui représente un épitope qui a été déterminé en utilisant des sérums de patients (Yajun et al., 1993) contrairement à CHLAM HS1 qui a été identifié grâce à des anticorps monoclonaux produits chez la souris (Yuan et al., 1992). Cette observation peut être expliquée si la série de patients testés ne contenait qu'une minorité de cas présentant des séquelles immunologiques comme l'infertilité. Il se peut aussi que les épitopes soient masqués par la MBP. Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait refaire le test ELISA soit en utilisant la protéine hsp60 totale tout en exerçant un contrôle rigoureux pour éviter de détecter les réactions croisées avec la hsp60 d'autres microorganismes, entreprise hasardeuse, soit en utilisant l'épitope HS1 ou HS2 après l'avoir découpé de la protéine fusion, ou bien en dénaturant la protéine fusion CHLAM HS-MBP par des agents dénaturants avant de la lier à la plaque.

En plus de ne pas réagir avec les épitopes de la protéine hsp60, les sérums testés par notre test ELISA ne réagissent pas avec la protéine MOMP de *C. psittaci*. C'est un résultat prévisible vu l'absence de psittacose au Canada.

Les sérums testés *C. pneumoniae* positifs par MIF n'ont pas réagi avec la protéine MOMP de *C. pneumoniae* par ELISA, résultats qu'on prévoyait quelque peu car nous avons utilisé la protéine MOMP dénaturée. On a donc envisagé de renaturer la protéine pour vérifier si dans sa forme native elle réagirait avec les sérums positifs. On pourrait alors obtenir par notre test ELISA des résultats s'approchant de ceux du test MIF et prouver que la protéine MOMP est la protéine reconnue par les anticorps spécifiques à l'espèce. Malheureusement, nos tentatives de renaturation ont échoué.

Cette procédure semblait pourtant prometteuse puisque le groupe de Meschede (1998), a réussi à mettre au point un test ELISA qui permet de détecter les anticorps dirigés contre les protéines E6 et E7 du papillomavirus dans les cancers cervicaux. La protéine E6 recombinante a été extraite dans des conditions dénaturantes (urée 8M) puis renaturée avant d'être déposée sur plaque. La protéine E6 renaturée retrouve non seulement son immunogénicité mais son activité biochimique. Une nouvelle fois la responsabilité de cet échec incombe au grand nombre de cystéines présentes dans la protéine MOMP. L'efficacité de la PDI à renaturer les protéines dépend sûrement de la quantité de ponts disulfures qu'elle doit défaire puis refaire correctement. Il est évident que renaturer la protéine MOMP qui possède neuf cystéines doit être plus compliquée que renaturer une protéine avec très peu de cystéines. La présence de la MBP fusionnée à notre protéine a peut-être empêché la PDI d'effectuer sa fonction. La combinaison d'une protéine d'environ 80 kDa et d'un grand nombre de ponts disulfures n'a sûrement pas aidé la formation de ponts disulfures stables par l'enzyme ou spontanément. Pour répondre aux questions concernant la protéine MOMP de *C. pneumoniae* qui restent encore en suspens, il faudrait envisager de cloner une protéine MOMP sans protéine fusion ou avec une autre protéine de fusion, une protéine MOMP tronquée ou tout simplement cloner séparément chacun des domaines variables dans l'espoir qu'ils donnent une protéine soluble qu'on pourrait alors utiliser directement pour le test ELISA. Cependant il faudra s'assurer de cloner une séquence assez grande de la protéine pour qu'elle puisse, une fois exprimée, se replier et donner aux épitopes qu'elle porte une conformation se rapprochant de celle de la protéine native. Des tests préliminaires montrent qu'une protéine MOMP tronquée est aussi insoluble que la protéine complète soit parce que nous n'avons pas encore trouvé les bonnes conditions d'induction ou parce que même des petites portions de MOMP sont insolubles. L'autre chose qu'on pourrait envisager c'est l'utilisation de vecteurs conçus spécialement pour produire des protéines solubles tels que le pET-32 qui génère une

protéine fusion avec la thioredoxine ou le pET-39b(+) et le pET-40b(+) qui portent respectivement la séquence de Dsb A et Dsb C des enzymes impliquées dans la formation des ponts disulfures au niveau de l'espace périplasmique, commercialisés par NOVAGEN. On pourrait également envisager de produire les protéines membranaires des *Chlamydia* grâce à des hôtes eucaryotes tel que la levure et les cellules d'insectes. Les *Chlamydia* étant des bactéries intracellulaires obligatoires, leur synthèse protéique a probablement lieu dans un environnement plus similaire à celui des cellules eucaryotes, au moins du point de vue ionique, que celui des bactéries. Il y aurait alors une possibilité que les protéines de *Chlamydia* exprimées dans de tels systèmes soient solubles. En effet, la majorité des protéines sur-exprimées dans les cellules d'insectes grâce aux vecteurs baculoviraux restent solubles alors qu'elles étaient insolubles lorsqu'exprimées dans les bactéries (Miller et al., 1986). Les systèmes d'expression eucaryotes possèdent plusieurs avantages surtout lorsqu'on veut produire des protéines eucaryotes puisqu'ils présentent tous les mécanismes nécessaires aux modifications post-transcriptionnelles des protéines tel que le clivage protéolytique, la glycosylation, la phosphorylation...(Vlak and Keus, 1990). Par contre ces avantages pourraient nuire à l'expression des protéines membranaires de *Chlamydia* ainsi qu'à leurs immunogénicités. La modification des protéines chlamydiennes pourrait empêcher leur reconnaissance par les anticorps humains lors du test ELISA.

Nous n'avons pas pu vérifier la réaction de nos sérums mis en présence de la protéine CrP60 parce que nous n'avons pas été capables de produire des quantités suffisantes de la protéine. La bactérie *E. coli* ne produit que de très faibles quantités de la protéine de fusion et dans certaines conditions bien particulières. Il est possible que ce soit dû à la taille de la protéine (100kDa) puisque Watson et al.(1994) ont réussi à en exprimer des bonnes quantités quand elle n'était pas sous forme de protéine de fusion. Toutefois, comme nous, ils ont obtenu une protéine insoluble

sous forme de corps d'inclusion. Ce qui est intéressant c'est que ces corps d'inclusion sont immunogènes, on pourrait donc les utiliser tels quels pour produire un test ELISA en les liant à la plaque de microtitration et ainsi éviter les étapes d'extraction par agent dénaturant et tout ce qui s'en suit. On pourrait aussi essayer de cloner des protéines tronquées pour réduire la taille de la protéine fusion par exemple la partie N-terminale de la protéine que Watson et al. (1994) ont identifié comme portant un épitope spécifique aux genres.

C. pneumoniae infecte les voies respiratoires en particulier les macrophages alvéolaires et c'est grâce à ces derniers qu'elle atteint la circulation sanguine. Ils se transforment en monocytes circulants qui vont la conduire à un site qui nous intéresse particulièrement: la paroi des vaisseaux sanguins. Ceci est le trajet proposé par les chercheurs pour expliquer comment *C. pneumoniae* se rend dans la paroi artérielle pour ensuite jouer un rôle dans le processus de l'athérosclérose (Moazed et al., 1998). Une dizaine d'études réalisées à travers le monde ont mis en évidence la présence de *C. pneumoniae* dans les artères d'individus atteints d'athérosclérose. Nous avons donc voulu savoir s'il y avait une corrélation entre la présence d'anticorps anti-*C. pneumoniae* dans le sérum, la présence de la bactérie dans les monocytes circulants et dans la biopsie de tissu malade chez des patients ayant subi une chirurgie cardio-vasculaire. Pour déterminer si la bactérie se trouvait dans les cellules de la paroi artérielle et dans les monocytes, nous avons effectué des PCR sur des extraits d'ADN provenant des tissus réséqués par les chirurgiens mais aussi sur des extraits d'ADN provenant des cellules du sang de ces patients. Nous avons employé trois séquences d'amorces spécifiques à *C. pneumoniae*. Comme Weiss et al. (1996) et Patterson et al. (1998) et malgré le fait d'avoir recherché la bactérie grâce à des amorces qui amplifient différents gènes, nous avons dû conclure qu'aucun des anévrysmes de

l'aorte et aucun sang fournis par les chirurgiens ne contenaient la bactérie *C. pneumoniae*. Les raisons possibles de cet échec sont nombreuses : Les biopsies d'artères que nous avons analysées ne contenaient peut-être pas de cellules spumeuses qui abritent généralement les *C. pneumoniae* pour deux raisons, la taille très petite du tissu que l'on a extrait ou la migration des cellules spumeuses vers la solution saline dans laquelle la biopsie a été placée avant qu'on la récupère et qu'on la congèle. Étant donné que nous n'avons pas vérifié par microscopie électronique la composition cellulaire des tissus athéromateux, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses. Par contre il est évident que le fait d'avoir trouvé que la plupart de nos spécimens contenaient des inhibiteurs et d'être obligé de diluer l'extrait utilisé pour le PCR, a certainement diminué nos chances d'amplifier l'ADN de *C. pneumoniae*. Il n'y a sans doute pas une grande concentration de bactéries au niveau des artères et par conséquent pas beaucoup d'ADN. Le fait de diluer cette faible quantité d'ADN a éliminé la possibilité qu'on détecte des séquences d'ADN spécifiques à *C. pneumoniae*.

5 BIBLIOGRAPHIE :

Bavoil, P., Ohlin, A., and Schachter, J. (1984). Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*. **44** : 479-485.

Bishai, W. R., Rappuoli, R. and Murphy, J.R. (1987). High-level expression of proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **169** : 5140-5151.

Black, M. C. (1997). Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. **10** : 160-184.

Blackwell, J.R. and Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Letters*. **295** : 10-12.

Blasi, F., Cosentini, R., Raccanelli, R., Massari, F. M., Arosio, C., Tarsia, P. and Allegra, L. (1997). A possible association of *Chlamydia pneumoniae* and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age. *Chest*. **112** : 309-312.

Boman, J., Söderberg, S., Forsberg, J., Birgander, L. S., Allard, A., Persson, K., Jidell, E., Kumlin, U., Juto, P., Waldenström, A. and Wadell, G. (1998). High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and in middle-aged blood donors. *The Journal of Infectious Diseases*. **178** : 274- 277.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72** : 248-254.

Braun, J. S., Laitko, J. T., Eggens, U., Wu, P., Distler, A. and Sieper, J. (1992). *Chlamydia pneumoniae* – a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **53** : 100-105

Brunham, R. C., Maclean, I. W., Binns, B. and Peeling, R. W. (1985). *Chlamydia trachomatis* : its role in tubal infertility. *The Journal of Infectious Diseases*. **152** : 1275-1282.

Brunham, R. C., Peeling, R., Maclean, I., Kossein, M. L. and Paraskevas, M. (1992). *Chlamydia trachomatis* associated ectopic pregnancy : serologic and histologic correlates. *The Journal of Infectious Diseases*. **165** : 1076-1081.

Caldwell, H. D., Kromhout, J., Schachter, J. (1981). Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*. **31** : 1161-1176.

Campbell, L. A., Kuo, C-C., Wang, S-P. and Grayston, J. T. (1990). Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **28** : 1261-1264.

Campbell, L. A., Melgosa, M. P., Hamilton, D. J., Kuo, C-C. and Grayston, J. T. (1992). Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. **30** : 434-439.

Campbell, L. A., O'Brien, E. R., Cappuccio, A. L., Kuo, C-C., Wang, S-P., Stewart, D., Patton, D. L., Cummings, P. K. and Grayston, J. T. (1995). Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. *The Journal of Infectious Diseases*. **172** : 585-588.

Campbell, S., Richmond, S. J., Yates, P. (1989). The development of *Chlamydia trachomatis* inclusions within the host eukaryotic cell during interphase and mitosis. *Journal of General Microbiology*. **135** : 1153-1165.

Carter, M. W., Al-Mahdawi, S. A. H., Giles, I. G., Treharne, J. D., Ward, M. E. and Clarke, I. N. (1991). Nucleotide sequence and taxonomic value of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia pneumoniae* IOL-207. *Journal of General Microbiology*. **137** : 465-475.

Chi, E. Y., Kuo, C-C. and Grayston, J. T.(1987). Unique structure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Journal of Bacteriology*. **169** : 3757-3763.

Christiansen, G., Østergaard, L. and Birkelund, S. (1997). Molecular biology of the

Chlamydia pneumoniae surface. Scandinavian Journal of Infectious Diseases suppl **104** : 5-10.

Cook, P. J. and Honeybourne, D. (1994). *Chlamydia pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **34** : 859-873.

Dahlén, G. H., Boman, J., Birgander, L. S. and Lindblom, B. (1995). Lp(a) lipoprotein, IgG, IgA and IgM antibodies to *Chlamydia pneumoniae* and HLA class II genotype in early coronary artery disease. Atherosclerosis. **114** : 165-174.

Davidson, M., Kuo, C-C., Middaugh, J. P., Campbell, L. A., Wang, S-P., Newman, W. P., Finley, J. C. and Grayston, J. T. (1998). Confirmed previous infection with *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis. Circulation. **98** : 628-633.

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

Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. and Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Science. **262** : 1744-1747.

Domeika, M., Domeika, K., Paavonen, J., Mårdh, P. A. and Witkin, S. S. (1998). Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-

shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *The Journal Of Infectious Diseases*. **177** : 714-719.

Felleisen, R ., Zimmermann, V., Gottstein, B. and Müller, N. (1996). Use of 96-well format for affinity purification of maltose-binding protein (MBP) fusion proteins. *BioTechniques*. **20** : 617-620.

Fong, I. W., Chiu, B., Viira, E., Fong, M. W., Jang, D. and Mahony, J. (1997). Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** : 48-52.

Frost, E. H., Deslandes, S. and Bourgaux-Ramoisy, D. (1993). Sensitive detection and typing of *Chlamydia trachomatis* using nested polymerase chain reaction. *Genitourinary Medicine*. **69** : 290-294.

Fuster, V., Ross, R., Topol, E. J. (1996). *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Lippincott-Raven Philadelphia. 363-539.

Gaydos, C. A., Quinn, T. C. and Eiden, J. J. (1992). Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **30** : 796-800.

Gaydos, C. A., Summersgrill, J. T., Sahney, N. N., Ramirez, J. A. and Quinn, T. C. (1996). Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells and aortic artery smooth muscle cells. *Infection and Immunity*. **64** : 1614-1620.

Godzik, K. L., O'Brien, E. R., Wang, S-K. and Kuo, C-C. (1995). In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. **33** : 2411-2414.

Grayston, J. T., Kuo, C-C., Campbell, L. A. and Altman, J. (1986). A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *New England Journal of Medicine*. **315** : 161-168.

Grayston, J. T., Campbell, L. A., Kuo, C-C., Mordhorst, C. H., Saikku, P., Thom, D. H., and Wang, S-P. (1990). A new respiratory tract pathogen : *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Journal of Infectious Diseases*. **161** : 618-625.

Grayston, J. T. (1992). Infection caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clinical Infectious Diseases*. **15** : 757-763.

Grayston, J. T., Kuo, C-C., Coulson, A. S., Campbell, L. A., Lawrence, R. D., Lee, M. J., Strandness, E. D. and Wang, S-P. (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. **92** : 3397-3400.

Gupta, S., Leatham, E. W., Carrington, D., Mendall, M. A., Kaski, J. C. and Camm, A. J. (1997). Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation*. **96** : 404-407.

Gurfinkel, E., Bozovich, G., Daroca, A., Beck, E. and Mautner, B. (1997). Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes : ROXIS pilot study. *The Lancet*. **350** : 404-407.

Hahn, D. L., Dodge, R., Golubjantnikov, R. (1991). Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with Wheezing, asthmatic bronchitis and adult-onset asthma. *Journal of American Medicine Association*. **299** : 255-230.

Hartley, D. L. and Kane, J. F. (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*. **16** : 101-102.

Heinemann, M., Susa, M., Simnacher, U., Marre, R. and Essig, A. (1996). Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infection and Immunity*. **64** : 4872-4875.

Herring, A. J. (1992). The molecular biology of chlamydia - a brief overview. *Journal of Infection*. Suppl **25** : 1-10.

Holland, S. M., Gaydos, C. A. and Quinn, T. C. (1990) Detection and differentiation of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification. *The Journal of Infectious Diseases*. **162** : 984-987.

Iijima, Y., Miyashita, N., Kishimoto, T., Kanamoto, Y., Soejima, R. and Matsumoto, A. (1994). Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. **32** : 583-588.

Jackson, L. A., Campbell, L. A., Schmidt, R. A., Kuo, C-C., Cappuccio, A. L., Lee, M. J. and Grayston, J. T. (1997). Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma : Evaluation of the innocent bystander hypothesis. *American Journal of Pathology*. **150** : 1785-1790.

Jantos, C. A., Heck, S., Roggendorf, R., Sen-Gupta, M. and Hegemann, J. H. (1997). Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** : 620-623.

Juvonen, J., Juvonen, T., Laurila, A., Alakarppa, H., Lounatmaa, K., Surcel, H. M. and al. (1997). Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*. **25** : 499-505.

Kalayoglu, M. V. and Byrne, G. I. (1998a). Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*. **177** : 725-729.

Kalayoglu, M. V. and Byrne, G. I. (1998b). A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*. **66** : 5067-5072.

Kaukoranta tolvanen, S. S., Teppo, A. M., Laitinen, K., Saikku, P., Linnavuori, K. and Leinonen, M. (1996). Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microbial Pathogenesis*. **21** : 215-221.

Kol, A., Sukhova, G. K., Lichtman, A. H., and Libby, P. (1998). Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. **98** : 300-307.

Kuo, C-C., Shor, A., Campbell, L. A., Fukushi, H., Patton, D. L. and Grayston, J. T. (1993a). Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *The Journal of Infectious Diseases*. **167** :841-849.

Kuo, C-C., Gown, A. M., Benditt, E. P. and Grayston, J. T. (1993b). Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. **13** : 1500-1504.

Kuo, C-C., Grayston, J. T., Campbell, L. A., Goo, Y. A., Wissler, R. W. and Benditt, E. P. (1995 a). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proceedings of The National Academy of Sciences of USA*. **92** : 6911-6914.

Kuo, C-C., Jackson, L. A., Campbell, L. A. and Grayston, J. T. (1995 b). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clinical Microbiology Reviews*. **8** : 451-461.

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

Laitinen, K., Laurila, A., Pyhälä, L., Leinonen, M. and Saikku P. (1997). *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infection and Immunity*. **65** : 4832-4835.

Le Gouill, C., Parent, J-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry*. **219** : 164.

Leinonen, M., Linnanmäki, E., Mattila, K., Nieminen, M. S., Valtonen, V., Leirisalo-Repo, M. and Saikku, P. (1990). Circulating immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial infarction. *Microbial Pathogenesis*. **9** : 67-73.

Linnanmäki, E., Leinonen, M., Mattila, K., Nieminen, M. S., Valtonen, V. and Saikku, P. (1993). *Chlamydia pneumoniae*-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation*. **87** : 1130-1134.

Martin, D., Bursill, J., Qui, M. R., Breit, S. N., Campbell, T. (1998). Alternative hypothesis for efficacy of macrolides in acute coronary syndromes. *The Lancet*. **351** : 1858-1859.

- McClarty, G. (1994). *Chlamydiae* and the biochemistry of intracellular parasitism. Trends in Microbiology. **2** : 157-164.
- Mehta, S. J., Miller, R. D., Ramirez, J. A. and Summersgill, J. T. (1998). Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in Hep-2 cells by interferon- γ : role of tryptophan catabolism. The Journal of Infectious Diseases . **177** : 1326-1331.
- Melgosa, M. P., Kuo, C-C. and Campbell, L. A. (1991). Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia pneumoniae*. Infection and Immunity. **59** : 2195-2199.
- Melnick, S. L., Shahar, E., Folsom, A. R., Grayston, J. T., Sorlie, P. D., Wang, S-P. and Szklo, M. (1993). Past infection by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. The American Journal of Medicine. **95** : 499-504.
- Mendall, M. A., Carrington, D., Strachan, D., Patel, P., Molineaux, N., Levi, J., Toosey, T., Camm, A. J. and Northfield, T. C. (1995). *Chlamydia pneumoniae*: Risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease. Journal of Infection. **30** : 121-128.
- Mengue Metogho, R., Deslandes, S. and Frost, E. H. (1999). Comparaison of PCR protocols including positive controls for detection of *Chlamydia pneumoniae* in respiratory specimens. Molecular and Cellular Probes. **13** : 71-75.

Meschede, W., Zumbach, K., Graspennig, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L. and Pawlita, M. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** : 475-480.

Miettinen, H., Lehto, S., Saikku, P., and al. (1996). Association of *Chlamydia pneumoniae* and acute coronary artery disease events in non-insulin dependant diabetic and non diabetic subjects in Finland. *European Heart Journal*. **17** : 682-688.

Miller, D. W., Safer, P. and Miller, L. K. (1986). An insect baculovirus host vector for high-level expression of foreign genes. *Genetic Engineering* vol 8. J. K. Setlow and A. Hollander Plenum, New York. 277-298.

Moazed, T. C., Grayston, J. T. and Campbell, L. A. (1994). A rabbit model of *Chlamydia pneumoniae* infection. Abstr B-214 p 66 In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Moazed, T. C., Kuo, C-C., Patton, D. L., Grayston, J. T. and Campbell, L. A. (1996). Experimental rabbit models of *Chlamydia pneumoniae* infection. *American Journal of Pathology*. **148** : 667-676.

Moazed, T. C., Kuo, C-C., Grayston, J. T. and Campbell, L. A. (1997). Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. *The Journal of Infectious Diseases*. **175** : 883- 890.

Moazed, T. C., Kuo, C-C., Grayston, J. T. and Campbell, L. A. (1998). Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *The Journal of Infectious Diseases*. **177** : 1322-1325.

Molestina, R. E., Dean, D., Miller, R. D., Ramirez, J. A. and Summersgill, J. T. (1998). Characterization of strain of *Chlamydia pneumoniae* isolated from a coronary atheroma by analysis of the *omp1* gene and biological activity in human endothelial cells. *Infection and Immunity*. **66** : 1370-1376.

Morrison, R. P., Lyng, K. and Caldwell, H. D. (1989). Chlamydial disease pathogenesis : ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57kD protein. *The Journal of Experimental Medicine*. **169** : 663-675.

Moss, T. R., Darougar, S., Woodland, R. M., Nathan, M., Dines, R. J. and Cathrine, V. (1993). Antibodies to *Chlamydia* species in patients attending a genitourinary clinic and the impact of antibodies to *C. pneumoniae* and *C. psittaci* on the sensitivity and specificity of *C. trachomatis* serology tests. *Sexually Transmitted Diseases*. **20** : 61-65.

Muhlestein, J. B., Anderson, J. L., Hammond, E. H., Zhao, L., Trehan, S., Schwobe, E. P and Carlquist, J. F. (1998). Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of

atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation*. **97** : 633-636.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. and Schaechter, M. (1994). *Physiologie de la cellule bactérienne : une approche moléculaire*. Masson Paris. 96-101.

Newhall, W. J. and Jones, R. B. (1983). Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of *Chlamydiae*. *Journal of Bacteriology*. **154** : 998-1001.

Nyström-Rosander, C., Thelin, S., Hjelm, E., Lindquist, O., Pålsson, C. and Friman, G. (1997). High incidence of *Chlamydia pneumoniae* in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **29** : 361-365.

O'Connor, S. (1999). Workshop on the potential role of infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Emerging Infectious Diseases*. **5** : 186-187.

Ozanne, G. and Lefebvre, J. (1992). Specificity of the microimmunofluorescence assay for the serodiagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infections. *Canadian Journal of Microbiology*. **38** : 1185-1189.

Patel, P., Mendall, M. A., Carrington, D., Strachan, D.P., Leatham, E., Molineaux, N., Levy, J., Blackeston, C., Seymour, C. A., Camm, A. J. and Northfield, T. C. (1995). Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *British Medical Journal*. **311** : 711-714.

Paterson, D. L., Hall, J., Rasmussen, S.J., Timms, P. (1998). Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of Australian patients. *Pathology*. **30** : 169-172.

Peeling, R. W. (1995). Laboratory diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases*. **6** : 198-203.

Peeling, R. W. and Brunham, R. C. (1996). Chlamydiae as pathogens : New species and new issues. *Emerging Infectious Diseases*. **2** :307-319.

Peeling, R. W., Kimani, J., Plummer, F., Maclean, I., Cheang, M., Bwayo, J. and Brunham, R.C. (1997). Antibody to Chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. *The Journal of Infectious Diseases*. **175** : 1153-1158.

Peterson, E. M., Cheng, X., Qu, Z. and De la Maza, L. M. (1996) Characterization of the murine antibody response to peptides representing the variable domains of the major outer membrane protein of *Chlamydia pneumoniae*. *Infection and Immunity*. **64** : 3354-3359.

Peterson, E. M., De la Maza, L. M., Brade, L. and Brade, H. (1998). Characterization of neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infection and Immunity*. **66** : 3848-3855.

Puolakkainen, M., Parker, J., Kuo, C-C., Grayston, J. T. and Campbell, L. A. (1995). Further characterization of *Chlamydia pneumoniae* specific monoclonal antibodies. *Microbiology and Immunology*. **39** : 551-554.

Ramirez, J. A., and the *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis study group. (1996). Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Annals of Internal Medicine*. **125** : 979-982.

Raulston, J. E. (1995). Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions. *Molecular Microbiology*. **15** : 607-616.

Saikku, P., Mattila, K., Nieminen, M. S., Huttunen, J. K., Leinonen, M., Ekman, M. R., Mäkelä, P. H. and Valtonen, V. (1988). Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *The Lancet*. **29** : 983-986.

Saikku, P. (1992a). The epidemiology and significance of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Infection*. **25** (suppl 1) : 27-34.

Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmäki, E., Ekman, M-R., Manninen, V., Mänttari, M., Frick, M. H. and Huttunen, J. K. (1992b). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Annals of Internal Medicine*. **116** : 273-278.

Saikku, P. (1997). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis- an update. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. suppl **104** : 53-56.

Schachter, J. (1997). DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies : what tests should be used for diagnosis of *Chlamydia* infections ? Immunological Investigations. **26** : 157-161.

Schein, C. H. and Noteborn, M. H. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. Bio/Technology. **6** : 291-294.

Schein, C. H. (1990). Solubility as a function of protein structure and solvent components. Bio/Technology. **8** : 308-317.

Shor, A., Kuo, C. C. and Patton, D. L. (1992). Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. South African Medical Journal. **82** :158-161.

Stephens, R. S. (1994). Molecular mimicry and *Chlamydia trachomatis* infection of eukaryotic cells. Trends in Microbiology. **2** : 99-101.

Stary, A. (1997). Chlamydia screening : which sample for which technique? Genitourinary Medicine. **73** : 99-102.

Su, H., Watkins, N. G., Zang, Y. X. and Caldwell, H. D. (1990). *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions : role of the Chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infection and Immunity*. **58** : 1017-1025.

Theunissen, J. J. H. Heijst van, B. Y. M., Chin-A-Lien, R. A. M., Wagenvoort, J. H. T., Stolz, E. and Michel, M. F. (1993). Detection of IgG, IgM and IgA antibodies in patients with uncomplicated *Chlamydia trachomatis* infection : a comparison between enzyme linked immunofluorescent assay and isolation in cell culture. *International Journal of Sexually Transmitted Diseases*. **4** : 43-48.

Thom, D. H., Wang, S-P., Grayston, J. T., Siscovick, D. S., Stewart, D. K., Kronmal, R. A. and Weiss, N. S. (1991). *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. **11** : 547-551.

Thom, D. H., Grayston, J. T., Siscovick, D. S., Wang, S-P., Weiss, N. S. and Daling, J. R. (1992). Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Journal of American Medical Association*. **268** : 68-72.

Toye, B., Laferrière, C., Claman, P., Jessamine, P. and Peeling, R. (1993). Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility. *The Journal of Infectious Diseases*. **168** :1236-1240.

Toye, B., Wood, W., Bobrowska, M., Ramotar, K. (1998). Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** : 2356-2358.

Vlak, J. M. and Keus, R. J. (1990). Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines. *Advances in Biotechnological Processes*. **14** :1-128.

Wagar, E. A., Schachter, J., Baviol, P., and Stephens, R. S. (1990). Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. *The Journal of Infectious Diseases*. **162** : 922-927.

Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1970). Immunologic relationship between genital TRIC lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *American Journal of Ophthalmology*. **70** : 367-374.

Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1991). *Chlamydia pneumoniae* elementary body antigenic reactivity with fluorescent antibody is destroyed by methanol. *Journal of Clinical Microbiology*. **29** : 1539-1541.

Watson, M. W., Al-Mahdawi, S., Lambden, P. R. and Clarke, I N. (1990). The nucleotide sequence of the 60kDa cysteine rich outer membrane protein of *Chlamydia pneumoniae* strain IOL-207. *Nucleic Acids Research*. **18** : 5299.

Watson, M. W., Lambden, P. R. and Clarke, I. N. (1991). Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **29** : 1188-1193.

Watson, M. W., Lambden, P. R., Everson, J. S. and Clarke, I. N. (1994). Immunoreactivity of the 60kDa cysteine-rich protein of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Microbiology*. **140** : 2003-2011.

Watson, M. W., Clarke, I. N., Everson, J. S. and Lambden, P.R. (1995). The CrP operon of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microbiology*. **141** : 2489-2497.

Weiss, S. M., Roblin, P. M., Gaydos, C. A., Cummings, P., Patton, D. L., Schulhoff, N., Shani, J., Frankel, R., Penney, K., Quinn, T. C., Hammerschlag, M. R. and Schachter, J. (1996). Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *The Journal of infectious Diseases*. **173** : 957-962.

World Health Organization. Press release WHO/64. 25 august 1995) « Sexually transmitted diseases ».

Yajun, Y., Zhong, G. and Brunham, R. C. (1993). Continuous B-cell epitopes in *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60. *Infection and Immunity*. **61** : 1117-1120.

Yang, Z-P., Kuo, C-C. and Grayston, J. T. (1993). A mouse model of *Chlamydia pneumoniae* strain Twar pneumonitis. *Infection and Immunity*. **61** : 2037-2040.

Yuan, Y., Zhang, Y-X., Watkins, N. G. and Caldwell, H. D. (1989). Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infection and Immunity*. **57** : 1040-1049.

Yuan, Y., Lyng, K., Zhang, Y-X., Rockey, D. D. and Morrison, R. P. (1992). Monoclonal antibodies define genus-specific, species-specific, and cross-reactive epitopes of the chlamydial 60-kilodalton heat shock protein (hsp60): specific immunodetection and purification of chlamydial hsp60. *Infection and Immunity*. **60** : 2288-2296.