

Université de Sherbrooke

**Vers une meilleure compréhension des cas d'échec de traitement  
de la chlamydiae génitale**

Par  
Patrick Dextras Paquette  
Programme de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Décembre 2013

Membres du jury d'évaluation

Eric H. Frost, Ph.D., microbiologie	Directeur de recherche
Brendan Bell, Ph.D., microbiologie	Membre du jury interne
Claude Déry, Ph.D., dép. biologie, Faculté des Sciences	Membre du jury externe



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-499-00313-3*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-499-00313-3*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

# Canada

## RÉSUMÉ

### Vers une meilleure compréhension des cas d'échec de traitement de la chlamydie génitale

Par  
Patrick Dextras Paquette  
Programme de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de  
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie,  
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La chlamydie génitale est une infection transmise sexuellement causée par la bactérie intracellulaire obligatoire *Chlamydia trachomatis*. Avec une incidence en constante augmentation depuis 1997, la chlamydie génitale représente aujourd'hui la maladie à déclaration obligatoire la plus rapportée au Canada et correspond à 80% de l'ensemble des ITS diagnostiquées. Par contre, environ 15% des patients traités pour la chlamydie génitale sont toujours infectés après la fin du traitement. Au-delà des réinfections possibles à la suite de contacts sexuels non-protégés avec un partenaire infecté, nous avons émis l'hypothèse que des causes bactériennes puissent être responsables des cas d'échec de traitement et d'infection persistante. Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire ont donc eu pour objectifs de déterminer si la résistance à l'azithromycine, la charge bactérienne de l'infection ou un génotype particulier de la bactérie, pourraient être associés aux cas d'échec de traitement et d'infection persistante.

Pour ce faire, une étude rétrospective de type cas-témoins composée de 204 patients ayant eu deux épisodes de chlamydie génitale ou plus entre 2002 et 2012 (506 spécimens cliniques analysés au total) a été mise sur pied. En se servant de *Campylobacter jejuni* comme organisme modèle, il a été possible de développer une nouvelle méthode de détection moléculaire des mutations ponctuelles basée sur la PCR en temps réel, que nous avons nommée TaqTm Probing. Cette méthode a par la suite été exploitée pour chercher des mutations pouvant conférer une résistance à l'azithromycine chez *C. trachomatis*. Toujours par PCR en temps réel, une méthode d'évaluation semi-quantitative de la charge bactérienne des spécimens cliniques a aussi été mise au point et les spécimens ont été caractérisés par le typage de la protéine majeur de la membrane externe.

Aucun cas de résistance n'a été observé, ni d'ailleurs de lien entre la charge bactérienne et l'évolution de l'infection vers un état de persistance ou d'échec de traitement. Par contre, il s'est avéré qu'une infection par le génotype E était significativement associée aux cas d'échec de traitement et d'infection persistante et augmentait le risque de survenue. Il sera important d'identifier subséquemment les mécanismes moléculaires impliqués.

**MOTS CLÉS :** *Chlamydia trachomatis*, échec de traitement, épidémiologie moléculaire, santé publique, infections transmises sexuellement, diagnostic.

*« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements. »*

*Charles Darwin*

*« La volonté de prévenir la maladie n'a pas pour seul objet l'individu et son milieu immédiat. La santé n'a pas de frontière nationale. »*

*Armand Frappier*

À Marie-Ève pour ton appui et tes encouragements!

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	II
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
 INTRODUCTION .....	 1
1.1    Préambule .....	1
1.2    Santé publique.....	2
1.2.1    Maladies à déclaration obligatoire .....	3
1.2.2    L'épidémiologie .....	3
1.3    Les infections transmissibles sexuellement (ITS) .....	4
1.3.1    Fardeau social des ITS .....	6
1.3.2 <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	7
1.3.2.1    Pathologie infectieuse .....	7
1.3.2.1.1    Le trachome.....	7
1.3.2.1.2    La lymphogranulomatose vénérienne .....	8
1.3.2.1.3    La chlamydiose génitale.....	8
1.3.2.2    Classification sérologique .....	10
1.3.2.3    Cycle de développement .....	11
1.3.2.3.1    État de persistance.....	12
1.4    Situation épidémiologique de la chlamydiose génitale.....	13
1.4.1    Échec de traitement de la chlamydiose génitale .....	15
1.4.2    Modification de la dynamique infectieuse de la chlamydiose génitale. 16	
1.5    Généralités sur les méthodes moléculaires .....	17
1.5.1    Une approche par épidémiologie moléculaire.....	17
1.5.2    Techniques d'amplification et de détection des acides nucléiques.....	19
1.5.2.1    Réaction d'amplification en chaine par polymérase en temps réel..	19
1.5.2.1.1    PCR Multiplexe.....	21
1.5.2.1.2    Quantification et semi-quantification.....	21
1.5.2.1.3    Courbe de dénaturation .....	22
1.5.2.1.4    Courbe de dénaturation à haute résolution.....	23
1.5.2.2    Réaction d'amplification en chaine nichée par polymérase.....	23

1.5.3	Techniques de typage moléculaire .....	24
1.5.3.1	Électrophorèse en champ pulsé .....	24
1.5.3.2	Le typage de séquence en loci multiples.....	25
1.5.3.3	L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction .....	25
1.6	Hypothèse de recherche pour expliquer les cas d'échec de traitement.....	26
1.6.1	Lien entre le génotype et les cas d'échec de traitement et d'infection persistante .....	27
1.6.1.1	Application de l'épidémiologie moléculaire à la chlamydie génitale.....	27
1.6.2	Développement de résistance chez <i>C. trachomatis</i> .....	28
1.6.2.1	Généralités sur les modes d'action des antibiotiques et les mécanismes de résistance .....	28
1.6.2.2	Traitement de la chlamydie génitale.....	29
1.6.2.3	Mécanisme commun de résistance entre <i>C. jejuni</i> et <i>C. trachomatis</i> .....	30
1.6.2.3.1	La campylobactériose en bref .....	31
1.6.2.3.2	Résistance aux macrolides .....	31
1.6.2.3.3	Résistance aux fluoroquinolones.....	32
1.6.2.4	Détection de résistances chez <i>C. trachomatis</i> .....	34
1.6.3	Charge bactérienne initiale.....	35
1.6.3.1	Évaluation de la charge bactérienne.....	36
1.7	Objectifs du projet de recherche .....	37
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		38
2.1	Liste des amorces et des sondes.....	38
2.2	Détection moléculaire de résistances chez <i>C. jejuni</i> .....	39
2.2.1	Préparation des extraits d'ADN .....	39
2.2.2	Approche par PCR TaqMan.....	40
2.2.3	Approche par analyse HRM.....	41
2.2.4	Approche par TaqTm Probing .....	42
2.2.4.1	Protocole final .....	43
2.3	Devis de l'étude cas-témoins sur les échecs de traitement de la chlamydie génitale.....	44
2.3.1	Échantillonnage.....	44

2.3.1.1	Prélèvements urogénitaux de patients .....	44
2.3.1.2	Souches de références .....	44
2.3.2	Préparation des échantillons.....	45
2.4	Mise au point de la méthode de détection de la résistance à l'azithromycine par PCR nichée en TaqTm Probing .....	45
2.4.1	Sélection des amorces .....	45
2.4.2	Extraction de l'ADN présent dans les selles .....	46
2.4.3	Développement du système multiplexe par PCR nichée .....	46
2.4.3.1	PCR externe .....	46
2.4.3.2	PCR interne .....	47
2.4.4	Protocole final .....	47
2.4.4.1	PCR externe .....	48
2.4.4.2	PCR interne .....	48
2.5	Combinaison des méthodes de génotypage et de détection de la résistance à l'azithromycine .....	48
2.5.1	PCR externe en multiplexe (ompA et 23S).....	49
2.5.2	PCR interne (ompA) .....	50
2.5.3	PCR interne (23S).....	50
2.6	Évaluation semi-quantitative de la charge bactérienne dans les spécimens cliniques .....	51
<b>RÉSULTATS.....</b>		<b>52</b>
3.1	Développement et mise au point de méthodes moléculaires .....	52
3.1.1	Détection de résistances aux antibiotiques chez <i>C. jejuni</i> .....	52
3.1.1.1	Approche par PCR TaqMan.....	52
3.1.1.2	Approche par analyse HRM.....	54
3.1.1.3	Approche par TaqTm Probing .....	56
3.1.1.3.1	Développement du TaqTm Probing.....	57
3.1.1.3.2	Optimisation du TaqTm Probing .....	60
3.1.1.3.3	Combinaison des deux PCR dans un système multiplexe.....	62
3.1.1.4	Évaluation de l'analyse diagnostique.....	63
3.1.1.4.1	Calcul de la sensibilité de et la spécificité .....	64
3.1.2	Mise au point de la méthode de détection de la résistance à l'azithromycine par PCR nichée en TaqTm Probing.....	66
3.1.2.1	Sélection des amorces .....	67

3.1.2.2	Développement du système multiplexe par PCR nichée .....	69
3.1.2.2.1	PCR externe .....	69
3.1.2.2.2	PCR interne .....	70
3.1.3	Combinaison des méthodes de génotypage et de détection de la résistance à l'azithromycine.....	73
3.1.4	Évaluation semi-quantitative de la charge bactérienne .....	74
3.2	PROJET: Résultats de l'investigation des causes bactériennes des échecs de traitement de la chlamydie génitale .....	75
3.2.1	Portrait des cas cliniques .....	75
3.2.2	Détection de résistance à l'azithromycine dans les spécimens cliniques.....	79
3.2.3	Génotypage des spécimens cliniques .....	82
3.2.4	Évaluation de la charge bactérienne dans les spécimens cliniques .....	84
DISCUSSION	.....	86
4.1	Rappel des objectifs .....	86
4.2	Portrait des cas cliniques.....	86
4.2.1	Détection de résistance dans les spécimens cliniques.....	87
4.2.2	Évaluation de la charge bactérienne dans les spécimens cliniques.....	89
4.2.3	Génotypage des spécimens cliniques .....	91
4.2.3.1	Association et causalité .....	92
4.2.3.1.1	Force de l'association.....	93
4.2.3.1.2	Convergence.....	93
4.2.3.1.3	Spécificité.....	93
4.2.3.1.4	Séquence temporelle .....	94
4.2.3.1.5	Gradient biologique.....	94
4.2.3.1.6	Plausibilité biologique et cohérence.....	95
4.2.3.1.7	Analogie .....	95
4.3	Analyse et synthèse.....	96
4.4	Conclusions et perspectives .....	98
5	REMERCIEMENTS.....	100
6	RÉFÉRENCES .....	101



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Classification des 12 plus importants agents infectieux pouvant être transmis lors de relations sexuelles non protégées .....	5
<b>Tableau 2:</b> Tableau de contingence pour l'évaluation d'un test diagnostique. ....	63
<b>Tableau 3:</b> Tableau de contingence en vue de l'évaluation de la capacité du TaqTm Probing à détecter la résistance à l'érythromycine chez <i>C. jejuni</i> . ....	66
<b>Tableau 4:</b> Tableau de contingence en vue de l'évaluation de la capacité du TaqTm Probing à détecter la résistance à la ciprofloxacine chez <i>C. jejuni</i> . ....	66
<b>Tableau 5:</b> Évaluation globale de la capacité du TaqTm Probing à détecter la résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine che <i>C. jejuni</i> . ....	66
<b>Tableau 6:</b> Classification des situations cliniques des patients en cas d'échec de traitement, de réinfection ou de persistance.....	76
<b>Tableau 7:</b> Évaluation de la distribution des valeurs de Tm obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance A2058C et C2611T dans les 506 prélèvements urogénitaux de <i>C. trachomatis</i> . ....	79

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Surveillance épidémiologique des ITS-MADO au Québec: 1990 à 2012 .....	13
<b>Figure 2:</b> Courbe d'amplification (Cp) selon différentes températures d'hybridation des amorces.....	53
<b>Figure 3:</b> Courbes de dénaturation haute résolution des amplicons spécifiques à une région de gène de l'ARNr 23S et du gène <i>gyrA</i> de <i>C. jejuni</i> . .....	55
<b>Figure 4:</b> Courbes de dénaturation (Tm) des amplicons spécifiques à une région du gène de l'ARNr 23S et du gène <i>gyrA</i> de <i>C. jejuni</i> . .....	58
<b>Figure 5:</b> Courbes d'amplification (Cp) et de dénaturation (Tm) des amplicons spécifiques à une région du gène de l'ARNr 23S et du gène <i>gyrA</i> de <i>C. jejuni</i> .....	59
<b>Figure 6:</b> Comparaison de différentes Taq polymérase pour la détection par TaqTm Probing de SNP de résistance dans le gène de l'ARNr 23S de <i>C. jejuni</i> .....	61
<b>Figure 7:</b> Comparaison de différents ratios d'asymétrie dans la concentration des amorces pour la détection par TaqTm Probing de SNP de résistance dans le gène de l'ARNr 23S de <i>C. jejuni</i> . .....	62
<b>Figure 8:</b> Analyse par TaqTm Probing du profil de résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez des spécimens de <i>C. jejuni</i> . .....	65
<b>Figure 9:</b> Alignement des séquences de gène de l'ARNr 23S de différentes bactéries des sphères uro-génitales et ano-rectales. ....	68
<b>Figure 10:</b> Comparaison de différentes Taq polymérase pour la PCR externe. ....	70
<b>Figure 11:</b> Courbes d'amplification (Cp) et de dénaturation (Tm) des amplicons produits par les PCR internes ciblant les SNP A2058C et C2611T dans le gène de l'ARNr 23S de <i>C. trachomatis</i> .....	71
<b>Figure 12:</b> Analyse par TaqTm Probing du profil de résistance à l'azithromycine de souches de référence des 15 génotypes de <i>C. trachomatis</i> . ....	72
<b>Figure 13:</b> Distinction entre <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> et <i>C. psittaci</i> , par l'analyse en TaqTm Probing du profil de résistance à l'azithromycine développé pour <i>C. trachomatis</i> . .....	73
<b>Figure 14:</b> Typage de souches de référence des 15 génotypes de <i>C. trachomatis</i> par analyse RFLP du gène <i>ompA</i> . .....	74

<b>Figure 15:</b> Courbes d'amplification (Cp) et de dénaturation (Tm) des amplicons produits par la PCR ciblant une région du plasmide cryptique de <i>C. trachomatis</i> .....	75
<b>Figure 16:</b> Distribution des cas de chlamydie génitale en fonction de différents groupes d'âge.....	77
<b>Figure 17:</b> Prévalence moyenne des génotypes de <i>C. trachomatis</i> associés aux cas de chlamydie génitale rapportés par quatre différentes études. ....	78
<b>Figure 18:</b> Valeurs de Tm obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance A2058C. ....	80
<b>Figure 19:</b> Valeurs de Tm obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance C2611T.....	81
<b>Figure 20:</b> Comparaison du rendement d'amplification entre la PCR interne ciblant le SNP A2858C et celle ciblant le SNP C2611T. ....	82
<b>Figure 21:</b> Prévalence moyenne des différents génotypes de <i>C. trachomatis</i> associés aux épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante.....	83
<b>Figure 22:</b> Proportion que représentent les différents groupes d'âge dans les épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante. ....	84
<b>Figure 23:</b> Proportion des épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante dont les prélèvements présentaient une charge bactérienne faible, moyenne ou forte.....	85

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ASPC	Agence de la santé publique du Canada
ASSS	Agence de la Santé et des Services sociaux
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BORSA	<i>Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CHUS	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
Cip <sup>R</sup>	Résistant à la ciprofloxacine
Cip <sup>S</sup>	Sensible à la ciprofloxacine
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Cp	<i>Crossing point</i>
dNTP	Désoxyribonucléotides
Ery <sup>R</sup>	Résistant à l'érythromycine
Ery <sup>S</sup>	Sensible à l'érythromycine
FN	Faux négatif
FP	Faux positif
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
HARSAH	Hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
INSPQ	Institut national de santé publique du Québec
ITS	Infections transmises sexuellement
ITSS	Infections transmissibles sexuellement et par le sang
kDa	kilodalton
LGV	Lymphogranulomatose vénérienne
LSPQ	Laboratoire de santé publique du Québec
mA	Milliampère
MADO	Maladies à déclaration obligatoire
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i>
MSSS	Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec
MTS	Maladies transmissibles sexuellement

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nvCT	<i>New Variant of Chlamydia trachomatis</i>
OMS	Organisation mondiale de la Santé
pb	Paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
QRDR	<i>Quinolone Resistance Determining Region</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RPM	Rotation par minute
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>
UV	Rayon ultraviolet
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VN	Vrai négatif
VP	Vrai positif
VPH	Virus du papillome humain
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
VRS	Virus respiratoire syncytial

## INTRODUCTION

### 1.1 Préambule

Le présent mémoire traitera des travaux de recherches en microbiologie et en épidémiologie moléculaire, qui ont été effectués afin de mieux comprendre les cas d'échec de traitement des infections génitales causées par la bactérie *Chlamydia trachomatis*.

Pour bien illustrer la problématique de cette infection transmissible sexuellement, ainsi que le contexte de santé populationnel dans lequel s'inscrivent ces travaux de recherche, un survol des principes de bases de la santé publique, de l'épidémiologie et de la dynamique infectieuse des ITS à déclarations obligatoires sera présenté.

Dans un deuxième temps, des notions propres à la situation épidémiologique des infections génitales causées par *C. trachomatis* seront abordées, tout comme le fardeau que cela représente pour la santé publique. Il sera également question plus spécifiquement de la pathogenèse associée à cette ITS et des impacts qu'elle cause sur la santé à court et long terme; le tout en plaçant en perspective les cas cliniques d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante.

En dernier lieu, les approches de laboratoire qui ont été privilégiées afin d'approfondir notre compréhension des échecs de traitement feront l'objet d'une dernière section d'introduction. Il s'agit essentiellement de techniques de biologie moléculaire appliquées à l'épidémiologie des infections à *C. trachomatis* et au diagnostic clinique.

## 1.2 Santé publique

En 1952, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a défini la santé publique comme étant « *la science et l'art de prévenir les maladies, de prolonger la vie et d'améliorer la santé et la vitalité mentale et physique des individus, par le moyen d'une action collective concertée* »<sup>1</sup>. Concrètement, cela revient à avoir une connaissance adéquate de la santé des populations et de ses déterminants, via des actions de surveillance sanitaire. Ces actions sont axées sur l'assainissement du milieu de vie, la lutte contre les maladies, l'enseignement des règles d'hygiène, l'organisation des services médicaux de prévention et sur la mise en œuvre de mesures sociosanitaires, assurant à chaque membre de la collectivité un niveau de vie compatible avec le maintien de la santé<sup>2</sup>.

Le système de santé publique doit donc se concentrer sur la protection de la santé de la population et la mise en place de conditions favorables au maintien et à l'amélioration de l'état de santé. En d'autres mots, les politiques et les interventions doivent s'articuler autour de la promotion de la santé et la prévention des maladies (Loi sur la santé publique du Québec). Au niveau de la santé globale des populations, la santé publique se retrouve en amont des services de soins de santé, tels que les cliniques et les hôpitaux (Simpson *et al.*, 2009). Alors que ces services de soins de santé se concentrent sur le traitement des malades, la santé publique vise plutôt à prévenir l'apparition des problèmes de santé et l'aggravation des maladies (Simpson *et al.*, 2009).

L'abondance et la diversité des agents biologiques, l'émergence et la réémergence de certains agents pathogènes, la sévérité des maladies qu'ils peuvent provoquer, leur facilité de transmission et de propagation et leur impact au niveau mondial, font des maladies infectieuses un des problèmes majeurs de santé publique (Simpson *et al.*, 2009).

---

<sup>1</sup> Organisation mondiale de la Santé ([http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_215\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_215_fre.pdf))

<sup>2</sup> Nations Unies (<https://www.un.org/french/ga/special/sids/agenda21/action6.htm>)

### **1.2.1 Maladies à déclaration obligatoire**

Par leur potentiel épidémique accru, les maladies à déclaration obligatoire (MADO) sont reconnues comme une menace sérieuse pour la santé publique. Ce sont des maladies infectieuses susceptibles de causer des épidémies si rien n'est fait pour les contrer. Les MADO font donc l'objet d'une surveillance rigoureuse de la part des autorités de santé publique<sup>3</sup>.

Au Québec, comme ailleurs au Canada, chaque cas déclaré de MADO est inscrit dans un registre central informatisé qui relie chacune des régions sociosanitaires. L'agrégation des informations colligées permet de dresser un portrait en temps réel de la prévalence et de l'incidence des différentes MADO dans la population. Le cas échéant, ceci permet d'initier rapidement une enquête sanitaire et des interventions adéquates s'il s'avérait qu'il y a une élévation anormale du nombre de cas d'une MADO donnée<sup>3</sup>.

### **1.2.2 L'épidémiologie**

L'épidémiologie est une science fondamentale sur laquelle reposent les interventions et les enquêtes de santé publique (ASPC, 2011). Toutefois, si on se place dans la perspective du XXI<sup>e</sup> siècle, on peut remonter le cours de l'histoire et se rendre compte que l'épidémiologie n'est pas une discipline nouvelle, loin de là!

Les premiers travaux épidémiologiques ont d'abord aidé à comprendre, à prévenir et à combattre les maladies épidémiques. Hippocrate (460-377 av. J.-C.) qui est considéré comme le premier épidémiologiste, a décrit les symptômes et l'évolution d'un certain nombre de maladies infectieuses qui sévissaient dans la Grèce antique, comme la pneumonie et les oreillons. Dans ses ouvrages, il a établi le lien entre les maladies et divers facteurs naturels et a fait ressortir l'importance de l'influence de l'environnement sur la santé. Thomas Sydenham (1624-1689) surnommé « l'Hippocrate anglais » s'est fait connaître par ses descriptions rigoureuses de maladies comme la goutte, le

---

<sup>3</sup> Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec  
(<http://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/mado/>)



paludisme, la rougeole et la syphilis (Hennekens *et al.*, 1998). Ces descriptions ont permis de voir ces maladies comme des entités distinctes et il a montré que si l'on voulait comprendre et éventuellement prévenir une maladie, il fallait d'abord la reconnaître et la décrire.

Toutefois, la reconnaissance de l'épidémiologie comme champ d'études est relativement récente, puisque la première étude significative remonte à 1854. À cette époque, John Snow (1813-1858) s'est servi de méthodes épidémiologiques pour étudier et maîtriser une éclosion de choléra dans la ville de Londres en Angleterre. Ses travaux sur la transmission du choléra et la découverte de son agent étiologique, la bactérie *Vibrio cholerae*, lui ont valu d'être reconnu comme le « père de l'épidémiologie de terrain » (Hennekens *et al.*, 1998). Il a en effet associé les cas de choléra à une exposition à de l'eau distribuée par certains fournisseurs de la ville, dont les sources d'approvisionnement étaient contaminées par des eaux d'égout.

La réflexion épidémiologique à travers les âges a grandement contribué à faire avancer notre compréhension de l'origine de la santé et de la maladie (Last *et al.*, 1998). Aujourd'hui, la définition de l'épidémiologie s'est élargie de telle sorte qu'elle englobe maintenant un vaste éventail de maladies, de comportements et d'événements liés à la santé (Last *et al.*, 1998). L'épidémiologie favorise un arrimage entre la santé publique et les milieux de soins, par la recherche clinique auprès de groupes d'individus affectés par un problème de santé. Dans un contexte de santé publique, l'épidémiologie fournit des éléments d'information qui orientent des interventions concrètes (ASPC, 2011). C'est une science qui participe directement aux actions de santé publique et permet d'étayer la prise de décision (ASPC, 2011).

### **1.3 Les infections transmissibles sexuellement (ITS)**

Anciennement connues sous le nom de maladies transmissibles sexuellement (MTS), les MTS sont maintenant appelées infections transmissibles sexuellement (ITS) ou parfois infections transmises sexuellement ou encore, en France, infections sexuellement transmissibles (IST). Ce changement d'appellation vient essentiellement du fait que lorsqu'il y a une « maladie » il doit par définition y avoir des symptômes.

Or, certaines « MTS » sont parfois asymptomatiques. Le terme « infection » devient alors plus approprié puisqu'une infection peut avoir lieu en présence ou en absence de symptômes. Ainsi, une personne atteinte d'une ITS ne se sent pas nécessairement malade, mais peut transmettre l'infection<sup>4</sup>. Il existe plus d'une trentaine d'agents pathogènes pouvant être transmis lors de relations sexuelles non protégées. Ils se divisent en 3 groupes dont voici un aperçu des 12 agents les plus importants (Tableau 1):

**Tableau 1: Classification des 12 plus importants agents infectieux pouvant être transmis lors de relations sexuelles non protégées**

GROUPES	ITS	AGENT INFECTIEUX
ITS bactériennes	Chlamydie génitale et la LGV	<i>Chlamydia trachomatis</i>
	Gonococcie	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Syphilis infectieuse	<i>Treponema pallidum</i>
	Chancres mou	<i>Haemophilus ducreyi</i>
	Granulome inguinal	<i>Klebsiella granulomatis</i>
ITS virales	Herpès génital	Virus herpès simplex de type I et II
	VIH/SIDA	Virus de l'immunodéficience humaine
	Condylomes	Papillomavirus humain
	Hépatite B	Virus de l'hépatite B
ITS parasitaires	Trichomonase	<i>Trichomonas vaginalis</i>
	Poux de pubis (morpions)	<i>Phthirus pubis</i>
	Gale	<i>Sarcoptes scabiei</i>

---

<sup>4</sup> Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec  
(<http://www.itss.gouv.qc.ca/index.php?mts-its-itss>)

La santé publique associe désormais au grand groupe des ITS des agents infectieux pouvant également être transmis par le sang. On parle alors d'infections transmissibles sexuellement et par le sang (ITSS). En plus des agents étiologiques des ITS tels que le VIH, le groupe des ITSS comprend le virus de l'hépatite B (transmission sexuelle et sanguine) et le virus de l'hépatite C (transmission sanguine). Tout comme le VIH/SIDA, le VHB et le VHC, la syphilis a également une transmission sanguine, notamment par le partage de matériel pour l'injection de drogues intraveineuses<sup>5</sup>.

### 1.3.1 Fardeau social des ITS

Le fardeau social représenté par les ITS demeure une source de préoccupation croissante en matière de santé publique (ASPC, 2009). Au Québec, comme ailleurs au pays, la chlamydie génitale, la gonococcie et la syphilis infectieuse sont considérées comme des MADO (ASPC, 2008). Ensemble, elles totalisent un peu plus de 70% de tous les cas de MADO recensés à l'échelle nationale (MSSS, 2011). Toutefois, la chlamydie génitale est responsable à elle seule de près de 80% des cas d'ITS bactériennes diagnostiqués annuellement (ASPC, 2009). Ceci en fait donc la MADO la plus fréquemment rapportée au Canada. À l'échelle mondiale, l'OMS estimait dans son plus récent rapport en 2008, qu'il y avait environ 500 millions de cas d'ITS bactériennes mondialement, dont 100 millions de cas de chlamydie génitale<sup>6</sup>.

De plus, les ITS sont reconnues pour être une source de détresse psychologique importante chez les patients (INSPQ, 2012), sans compter que le traitement que requièrent ces dizaines de milliers de cas au Québec seulement coûte très cher au système de santé chaque année (INSPQ, 2012). Par conséquent, on comprend mieux pourquoi la question des ITS, mais surtout de la chlamydie génitale, est au cœur des préoccupations de santé publique.

---

<sup>5</sup> Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec  
(<http://sante.gouv.qc.ca/problemes-de-sante/syphilis>)

<sup>6</sup> Organisation mondiale de la Santé  
(<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/index.html>)

### 1.3.2 *Chlamydia trachomatis*

La bactérie *C. trachomatis* est un pathogène intracellulaire obligatoire strictement humain appartenant à la famille des *Chlamydiaceae* (Hammerschlag, 2002). Cette famille comporte les genres *Chlamydia* et *Chlamydophila* (Everett *et al.*, 1999). Parmi les *Chlamydia* sp., nous retrouvons *C. trachomatis*, *C. muridarum* et *C. suis* (Everett *et al.*, 1999). Le genre *Chlamydophila* sp. regroupe quant à lui les espèces *C. pneumoniae*, *C. psittaci* et *C. pecorum* (Everett *et al.*, 1999).

Seules trois espèces de *Chlamydiaceae* sont pathogènes pour l'Homme, soit *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* (Cevenini *et al.*, 2002) et plus rarement *C. psittaci* (Harkinezhad *et al.*, 2009). Alors que *C. pneumoniae* et *C. psittaci* causent respectivement une infection respiratoire (Riska *et al.*, 2004) et une zoonose d'origine aviaire nommée psittacose (Harkinezhad *et al.*, 2009), *C. trachomatis* est à l'origine de trois différentes pathologies: le trachome, la lymphogranulomatose vénérienne (LGV) et bien entendu la chlamydie génitale (Bebear & de Barbeyrac, 2009).

#### 1.3.2.1 Pathologie infectieuse

##### 1.3.2.1.1 Le trachome

Le trachome est une infection oculaire caractérisée par une inflammation chronique de la conjonctive (kérato-conjonctivite) (Burton, 2007). C'est la première cause mondiale de cécité bactérienne, touchant approximativement 21 millions de personnes en 2011 selon l'OMS<sup>7</sup>, principalement dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique et du Moyen-Orient (Bebear & de Barbeyrac, 2009). Pour environ 10% de ces cas, les dommages oculaires sont trop importants et la cécité est irréversible<sup>7</sup>. L'OMS a fait la lutte au trachome cécitant une priorité de santé publique mondiale et espère l'éliminer d'ici 2020<sup>7</sup>. D'ailleurs, c'est lors de recherches

---

<sup>7</sup> Organisation mondiale de la Santé (<http://www.who.int/wer/2012/wer8717.pdf>)

sur l'identification de l'agent étiologique du trachome que la bactérie *C. trachomatis* a été identifiée pour la première fois en 1906.

#### 1.3.2.1.2 La lymphogranulomatose vénérienne

Tout comme la chlamydie génitale, la lymphogranulomatose vénérienne se transmet par contact sexuel (White, 2009). Il s'agit essentiellement d'une infection des ganglions lymphatiques inguinaux, évoluant vers une adénopathie causant des lésions inflammatoires chroniques. La majorité des personnes atteintes guérissent spontanément sans séquelles, quoi que cette infection ne doive pas être prise à la légère (White, 2009).

La LGV était très peu fréquente au Québec jusqu'en 2005. Seulement 10 cas avaient été déclarés entre 1990 à 2004 (MSSS, 2013). Toutefois, une augmentation importante a été observée en 2005 et 2006, où 25 et 44 cas respectivement ont été déclarés (MSSS, 2013). À l'exception d'un cas féminin observé en 2008, tous les cas déclarés au Québec jusqu'à maintenant sont des hommes (MSSS, 2013). La presque totalité des cas ont eu des relations sexuelles avec d'autres hommes (HARSAH) (98%) et c'est la région de Montréal qui regroupe la majorité des cas (82,6%) (MSSS, 2013). L'incidence de la LGV semble être stable depuis 2007, alors qu'entre 2 et 13 cas sont déclarés chaque année (MSSS, 2013).

#### 1.3.2.1.3 La chlamydie génitale

Considérée comme la plus importante ITS bactérienne au monde<sup>8</sup>, la chlamydie génitale – connue sous le nom commun de « chlamydia » – est une infection qui touche principalement l'épithélium du tractus urogénital (Paavonen, 2012) et dont la période d'incubation dure généralement de 2 à 6 semaines (ASPC, 2008).

Majoritairement asymptomatique (chez environ 80% des femmes et 50% des hommes atteints) (Magbanua *et al.*, 2007) la chlamydie génitale affecte autant les

---

<sup>8</sup> Organisation mondiale de la Santé  
(<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/index.html>)

hommes que les femmes (ASSS, 2006). Cette infection est particulièrement présente chez les adolescents et les jeunes adultes âgés de 15 à 24 ans (Bebear & de Barbeyrac, 2009) (INSPQ, 2012). Les femmes sont par contre plus souvent diagnostiquées dû aux occasions de dépistage qui s'offrent plus fréquemment à elles, notamment lors des examens gynécologiques de routine et pour le contrôle des naissances.

En l'absence d'un traitement antibiotique, environ 50% des cas de chlamydie génitale se résorberont naturellement dans la première année (Geisler, 2010). À l'inverse, chez l'autre moitié des cas, l'infection asymptomatique pourra persister davantage dans le temps (Mpiga & Ravaoarino, 2006). Cette capacité à entrer dans un état de persistance est une caractéristique infectieuse de *C. trachomatis* qui est très importante au niveau de la santé publique. Cela permettant bien souvent à l'infection d'évoluer vers des formes cliniques plus sévères (Paavonen, 2012).

Chez la femme, l'infection chlamydienne remonte le tractus génital où se succèdent cervicite, endométrite et salpingite (Debattista *et al.*, 2003). Ultimement, on voit apparaître une atteinte inflammatoire pelvienne, une situation clinique qui apporte un lot d'effets préjudiciables importants sur la santé génésique de la femme (Quentin & Verdon, 2012). L'inflammation pelvienne chronique peut entraîner des lésions importantes et une obstruction des trompes de Fallope, due à la présence de tissu cicatriciel engendré par l'infection persistante (Paavonen, 2012). Avec le temps, ceci peut causer de la stérilité tubaire (Paavonen, 2012), des grossesses ectopiques et des douleurs pelviennes (Paavonen, 2012). La chlamydie génitale est également responsable de cas de fausses couches et d'avortements spontanés (Debattista *et al.*, 2003).

Chez l'homme, l'infection à *C. trachomatis* est la cause la plus fréquente d'urétrite non gonococcique (Bebear & de Barbeyrac, 2009). L'infection asymptomatique persistante peut évoluer vers une prostatite et une épididymite. Cette inflammation de la prostate et des testicules peut aboutir dans de rares cas à de l'infertilité (de Barbeyrac *et al.*, 2006).

Lors de la naissance, de 30 à 50% des nouveaux nés issus de mères ayant une chlamydie non traitée contractent une ophtalmie néonatale dans les 5 à 10 premiers jours de vie (Hammerschlag, 2011). Un risque accru pour les pneumonies à *C. trachomatis* est également rapporté pour ces nouveaux nés (Hammerschlag, 2011).

Il a été proposé que les infections chlamydiennes persistantes contribuent également à la progression des néoplasies cervicales induites par le virus du papillome humain (VPH) (Paavonen *et al.*, 2003) et augmente les risques de transmission du VIH (Pepin *et al.*, 1989). Dans des cas plus rares, l'infection se propage aux articulations et cause une arthrite réactionnelle (hyper sensibilité de type III) (Debattista *et al.*, 2003). Cette pathologie auto-immune peut évoluer en syndrome oculo-uréthro-synovial ou syndrome de Reiter (den Hartog *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.2 Classification sérologique

Le tropisme tissulaire observable quant à l'infection préférentielle par *C. trachomatis* des cellules de l'épithélium de l'œil (trachome), des monocytes ganglionnaires (LGV) ou de la muqueuse urogénitale (ITS), se caractérise en fonction de 15 sérotypes différents (Wang & Grayston, 1975). De façon générale, les sérotypes A, B, Ba et C sont associés au trachome (Frost *et al.*, 1995), les sérotypes Ba, D, E, F, G, H, I, J, K, sont associés à la chlamydie génitale (Frost *et al.*, 1993) et les sérotypes L1, L2 et L3 sont associés à la lymphogranulomatose vénérienne (Frost *et al.*, 1993).

La distinction des différents sérotypes se fait à l'aide d'une épreuve sérologique par anticorps monoclonaux qui exploite les différences dans la protéine majeure de la membrane externe (*Major Outer Membrane Protein*, MOMP) (Wang *et al.*, 1985). Cette protéine est codée par le gène *ompA* (Stephens & Lammel, 2001) et se retrouve chez tous les sérotypes de *C. trachomatis*. Elle est constituée de 4 domaines variables hydrophiles exposés en surface (Yuan *et al.*, 1989), encadrés par 5 domaines constants hydrophobes enchâssés dans la membrane (Lampe *et al.*, 1995).

### 1.3.2.3 Cycle de développement

Les bactéries intracellulaires obligatoires sont caractérisées par un cycle de vie bien particulier (Hammerschlag, 2002) (Mpiga & Ravaoarino, 2006). Dans le cas des *Chlamydiaceae*, il s'agit d'un cycle pléomorphe composé de deux formes bactériennes distinctes, soit le corps élémentaire (forme extracellulaire) et le corps réticulé (forme intracellulaire) (Byrne & Ojcius, 2004). La forme infectieuse, appelée corps élémentaire, est responsable de l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte qu'elle doit parasiter pour se reproduire (Mpiga & Ravaoarino, 2006). Sous cette forme extracellulaire, la bactérie est sphérique, de petite taille (0,2 à 0,6  $\mu\text{m}$ ), possède un nucléoïde compact et est métaboliquement inactive, ce qui la rend naturellement résistante aux antibiotiques (Hu & Coates, 2012). Les corps élémentaires sont internalisés dans les cellules hôtes par endocytose et forment ensuite des inclusions cytoplasmiques qui résistent à la formation de phagolysosomes (Heinzen *et al.*, 1996). À l'intérieur de ces inclusions, les corps élémentaires se différencient rapidement en corps réticulés, la forme de reproduction de la bactérie (Mpiga & Ravaoarino, 2006). À la différence des corps élémentaires, les corps réticulés sont de plus grande taille (0,6 à 1,5  $\mu\text{m}$ ), ont un nucléoïde moins dense, sont métaboliquement actifs et capables de se multiplier par scission binaire (Mpiga & Ravaoarino, 2006). Leur métabolisme actif les rendent par contre sensibles à l'action des antibiotiques (Hu & Coates, 2012).

L'accumulation des corps réticulés au sein des inclusions cytoplasmiques crée de véritables petites colonies bactériennes à l'intérieur de la cellule hôte (Byrne & Ojcius, 2004). Après environ 36h de division, les corps réticulés se transforment progressivement en corps élémentaires. Ces derniers seront à priori libérés dans l'environnement extracellulaire par exocytose, puis par la lyse de la cellule infectée (Hammerschlag, 2002). Il faut en moyenne de 48 à 72h aux chlamydies pour effectuer un cycle de reproduction complet (Wyrick, 2010).

Les corps élémentaires sont entourés d'une paroi rigide proche de celle des bactéries à Gram négatif (Mpiga & Ravaoarino, 2006). Toutefois, la paroi des chlamydies n'est pas composée de peptidoglycane (Mpiga & Ravaoarino, 2006).



Il s'agit plutôt d'une structure supramoléculaire formée de la protéine OmpA (40 kDa) (Caldwell *et al.*, 1981), de la protéine Omp2 (60kDa) et de la lipoprotéine omp3 (15 kDa) (Mpiga & Ravaoarino, 2006). Ces protéines sont liées entre elles par des ponts disulfures, ce qui confère à la cellule bactérienne une rigidité, une résistance aux facteurs mécaniques et une stabilité osmotique (Mpiga & Ravaoarino, 2006). La protéine ompA joue également un rôle dans l'adhésion des corps élémentaires à la cellule hôte, via des interactions électrostatiques et hydrophobes avec des récepteurs cellulaires. Par contre, lorsque la chlamydie est internalisée dans une cellule, la protéine ompA agit plutôt comme une porine (Nunes *et al.*, 2009). Elle augmente la perméabilité membranaire, ce qui permet la transformation des corps élémentaires en corps réticulés (Nunes *et al.*, 2009). La paroi plus mince et flexible des corps réticulés est plus apte à incorporer les nutriments présents dans la cellule parasitée (Bastidas *et al.*, 2013).

#### 1.3.2.3.1 État de persistance

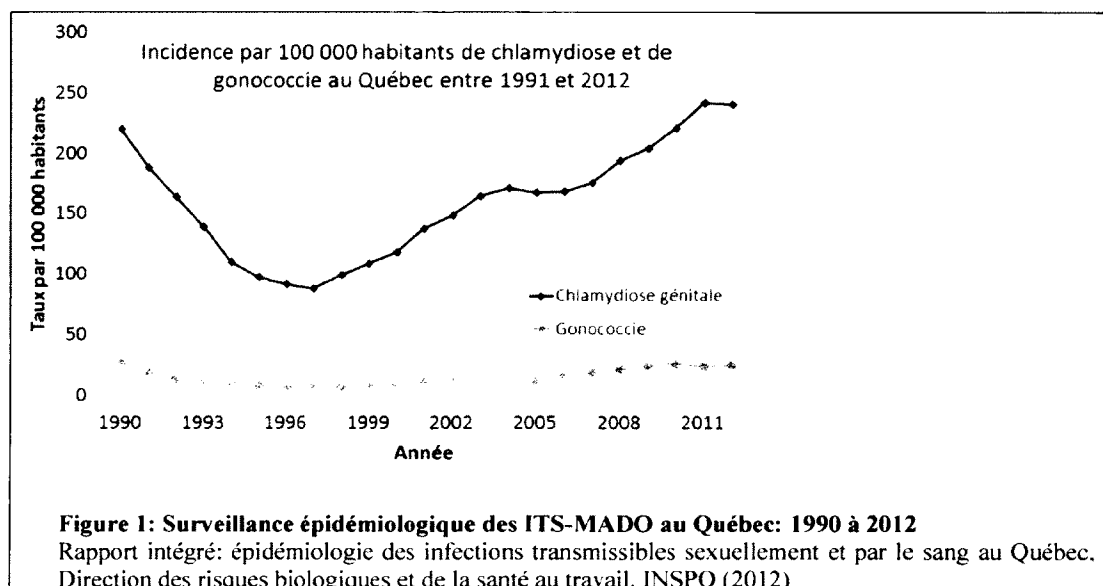
Lorsque le cycle de développement normal des chlamydies est altéré par des conditions adverses, ces dernières entrent dans un état de persistance intracellulaire où elles ne se divisent plus (Bastidas *et al.*, 2013). Cet état est comparable à celui des cellules viables non cultivables (Oliver, 2005) tel que décrit chez la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Gerard *et al.*, 2006). L'état de persistance se caractérise par un arrêt du métabolisme (Gerard *et al.*, 2002), une inhibition de la différenciation des corps réticulés en corps élémentaires et par une réduction de la synthèse de la protéine ompA (Millman *et al.*, 2001). L'état de persistance cause également une altération morphologique des chlamydies qui, en comparaison avec les corps réticulés, s'élargiront tout en adoptant une forme atypique (Beatty *et al.*, 1995).

Divers facteurs peuvent initier la persistance des chlamydies. Il peut s'agir d'une antibiothérapie (Hammerschlag, 2002), d'une diminution des nutriments disponibles (Harper *et al.*, 2000) ou d'une carence en tryptophane causée par la présence d'interféron gamma (Leonhardt *et al.*, 2007). Cette cytokine induit l'activation de l'indoleamine-2,3-dioxygénase, une enzyme responsable de la dégradation de cet acide aminé essentiel (Mpiga & Ravaoarino, 2006).

Plongées littéralement dans un état de dormance, les chlamydiae deviennent insensibles aux manques de nutriment et aux mécanismes de défense immunitaire (Mpiga & Ravaoarino, 2006). De plus, elles acquièrent une résistance passive aux antibiotiques: d'une part, les formes persistantes contiennent des taux réduits de la porine ompA, d'où une diminution de pénétration des antibiotiques hydrophiles; et d'autre part, parce qu'étant dans un état métaboliquement inactifs, les antibiotiques se retrouvent à avoir un effet très réduit sur les bactéries (Hammerschlag, 2002; Binet & Maurelli, 2005).

#### 1.4 Situation épidémiologique de la chlamydie génitale

C'est en 1990 que la chlamydie génitale est devenue une MADO au Canada. Après avoir connu une régression constante de 1990 à 1997, période durant laquelle l'infection a diminué de 60%, cette tendance s'est subitement inversée (Parent & Alary, 1999). En effet, à partir de 1997, l'incidence de chlamydie génitale n'a cessé d'augmenter à raison de 6,8% par année en moyenne (ASPC, 2010). En somme, le nombre de cas déclarés d'infection génitale à *C. trachomatis* a littéralement triplé durant les 15 dernières années, autant chez les hommes que chez les femmes et dans tous les groupes d'âge (INSPQ, 2012) (Figure 1).



Au Québec en 2011, environ 20 000 cas de chlamydie génitale ont été recensés. Alors que 68% des cas se retrouvent chez les femmes (MSSS, 2013), on en compte environ 10 000 cas chez les filles âgées de 15 à 24 ans et un peu plus de 3 000 cas chez les garçons du même groupe d'âge (MSSS, 2013). Au total, 67% des cas d'infection génitale à *C. trachomatis* déclarés en 2011 l'ont été chez des jeunes de 15 à 24 ans (INSPQ, 2012). À l'échelle canadienne, c'est environ 80% des cas de chlamydie génitale qui sont recensés dans cette tranche d'âge (ASPC, 2010). Des données comparables à ce qui est observé en Estrie, où environ 70% des cas se retrouvent chez les 15 à 24 ans<sup>9</sup>.

Ce phénomène n'est toutefois pas particulier au Canada. La plupart des pays industrialisés sont victimes d'une recrudescence de chlamydie génitale. Les États-Unis, l'Australie, le Royaume-Uni et plusieurs pays de l'Union européenne, particulièrement dans les pays scandinaves, dont la Norvège, le Danemark et la Suède, ont rapporté des tendances similaires (INSPQ, 2009). Aux États-Unis, on a observé une augmentation de 55% du taux de l'incidence de l'infection à *C. trachomatis* entre 2001 et 2010, avec une progression plus importante chez les hommes que les femmes (CDC, 2011). En 2010, les jeunes de 15 à 24 ans représentaient 61% des cas masculins et 75% des cas féminins (CDC, 2011).

Divers facteurs pouvant influencer à la hausse le nombre de cas rapportés de chlamydie génitale ont déjà été suggérés afin d'expliquer ce phénomène (MSSS, 2003). Parmi ceux-ci, notons les modifications des pratiques médicales quant au dépistage (MSSS, 2002), au traitement et à l'intervention préventive auprès des partenaires (Vickers *et al.*, 2009); la mise en place dans les laboratoires cliniques de nouvelles techniques de détection basées sur l'amplification des acides nucléiques (MSSS, 2002); l'amélioration apportée au traitement contre le VIH/SIDA, suscitant chez certains individus une diminution de la crainte associée aux pratiques sexuelles à risques (MSSS, 2002); le changement des mœurs sexuelles des adolescents et des jeunes adultes, en ce qui a trait à la précocité des relations sexuelles (MSSS, 2003), à la

---

<sup>9</sup> Agence de la santé et des services sociaux de l'Estrie  
([http://www.santeestrie.qc.ca/sante\\_publicque/protection\\_maladies\\_infectieuses/infections\\_transmissibles\\_sexuellement\\_sang%20.php](http://www.santeestrie.qc.ca/sante_publicque/protection_maladies_infectieuses/infections_transmissibles_sexuellement_sang%20.php))

multiplication des partenaires et à l'adoption de pratiques sexuelles plus à risque (Otis *et al.*, 1996); l'accroissement du nombre de personnes qui utilisent des moyens anonymes, tels que les sites web de rencontre, pour trouver des partenaires sexuels (MSSS, 2002); et finalement, un manque de connaissances générales dans la population sur les modes de transmission des ITS (MSSS, 2002).

De façon globale, il est impossible pour l'instant de déterminer quelle proportion de l'augmentation est attribuable aux hypothèses proposées (ASPC, 2008). L'utilisation de nouvelles techniques diagnostiques plus performantes et moins invasives explique certainement une partie de cette augmentation, mais n'explique pas à elle seule l'augmentation du nombre de cas rapportés de chlamydie génitale (Parent & Alary, 2000). D'autant plus que ces hypothèses ne sont pas suffisantes pour expliquer l'augmentation constante et marquée de la chlamydie génitale, en comparaison avec la gonococcie qui affiche des taux d'incidence beaucoup plus bas et plutôt stables (voir figure 1).

Avec les hypothèses suggérées, on s'attendrait également à voir une augmentation marquée de la gonococcie, suivie éventuellement d'un plafonnement du taux d'incidence pour ces deux ITS. Comme ce n'est pas le cas, il n'est donc pas possible d'exclure une augmentation réelle de l'incidence de chlamydie génitale (ASPC, 2008). Il est probable que nous assistions à une accélération bien réelle de cette épidémie (ASPC, 2008), ce qui a poussé en 2008 le *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC), l'équivalent américain de l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC), à faire du contrôle de l'épidémie de chlamydie génitale une priorité de santé publique nationale<sup>10</sup>.

#### **1.4.1 Échec de traitement de la chlamydie génitale**

En plus des données préoccupantes concernant la situation épidémiologique de cette ITS, une importante étude parue en 2005 aux États-Unis a révélé qu'on trouvait de nouveau *C. trachomatis* chez 10 à 15% des cas de chlamydie génitale un à trois mois

---

<sup>10</sup> CDC Chlamydia Immunology and Control Expert Advisory Meeting, Atlanta, Géorgie (É.-U.), 2008.

après un traitement antibiotique standard (Golden *et al.*, 2005). Des données qui ont été corroborées par le laboratoire de microbiologie clinique du CHUS, où la prévalence des échecs de traitement durant la période de 2001 à 2005 a été établie à 12%. À la lumière de ses données, il apparaît que la situation épidémiologique de la chlamydie génitale, mais encore davantage les cas d'échec de traitement, sont des éléments préoccupants et représente une priorité importante pour la santé publique (MSSS, 2011).

#### **1.4.2 Modification de la dynamique infectieuse de la chlamydie génitale**

Les données épidémiologiques des 15 dernières années, auxquelles s'ajoutent les cas rapportés d'échec de traitement depuis le milieu des années 2000, montrent sans équivoque qu'un changement s'opère dans la dynamique infectieuse de la chlamydie génitale.

Au niveau de l'épidémiologie classique, la dynamique infectieuse résulte d'une interaction complexe entre un hôte, un agent pathogène et l'environnement dans lequel ils évoluent (Simpson *et al.*, 2009). Ces trois éléments forment ce qu'on appelle en santé publique la « Triade épidémiologique ». L'hôte est un être vivant qui héberge et entretient un agent pathogène dans des conditions naturelles (INSPQ, 2011). Dans un contexte épidémiologique, l'hôte peut être une population, une sous-population ou un groupe d'individus (INSPQ, 2011). Pour sa part, l'agent pathogène est un microorganisme dont la présence est une condition essentielle à la survenue de la maladie infectieuse (INSPQ, 2011). Une telle maladie peut avoir un agent unique ou plusieurs agents différents agissant indépendamment (Last *et al.*, 1998). Finalement, l'environnement est tout ce qui est extérieur à l'hôte. C'est ce qui constitue le milieu d'interaction entre l'agent pathogène et l'hôte (Rutala & Weber, 2001). L'environnement peut être divisé en environnement physique, biologique, social, culturel, etc., chacun pouvant avoir une influence sur l'état de santé de l'hôte (Last *et al.*, 1998). En fonction de l'environnement dans lequel l'hôte évolue, son risque d'entrer en contact avec un agent pathogène particulier sera modulé à la hausse ou à la baisse (Last *et al.*, 1998). Dans une optique de santé publique, les différents aspects socio-comportementaux liés au mode de vie de l'hôte peuvent créer autour de lui un

environnement favorisant des interactions avec certains agents pathogènes (INSPQ, 2011).

L'acquisition d'une infection, de même que la survenue d'une éclosion, voire d'une épidémie, a lieu lorsqu'il y a un déséquilibre entre les éléments de la triade en faveur de l'agent pathogène (ASPC, 2011). Ce changement dans la dynamique infectieuse peut être causé par tout facteur qui augmente la susceptibilité de l'hôte, qui accroît le pouvoir infectieux de l'agent pathogène ou qui en facilite la transmission (INSPQ, 2011). Ces facteurs peuvent prendre différentes formes dépendamment de la maladie infectieuse étudiée. Dans le cas de la chlamydiose génitale, diverses hypothèses ont été avancées afin de mieux comprendre la situation épidémiologique, particulièrement en ce qui a trait aux échecs de traitement.

## **1.5 Généralités sur les méthodes moléculaires**

### **1.5.1 Une approche par épidémiologie moléculaire**

L'épidémiologie moléculaire offre une approche très performante afin d'explorer le rôle potentiel d'un génotype dans le changement de dynamique d'une maladie infectieuse (MacCannell, 2013). On peut définir l'épidémiologie moléculaire comme étant l'utilisation de techniques de biologie moléculaire pour résoudre des problèmes épidémiologiques (Foxman & Riley, 2001). Appuyée par des outils de bioinformatiques, l'épidémiologie moléculaire permet d'étudier l'origine des génotypes, leur évolution et leur diversité (Foxman & Riley, 2001).

Les méthodes d'épidémiologie moléculaire sont basées sur l'amplification, la détection et l'analyse de la séquence des acides nucléiques (MacCannell, 2013). L'innovation avec ces méthodes c'est qu'elles reposent sur une analyse des variations génétiques ponctuelles présentes entre les génomes des membres d'une même espèce (Urwin & Maiden, 2003). Ce sont ces variations génétiques appelées polymorphisme nucléotidique (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), qui sont à l'origine des différences génotypiques qui existent entre les souches microbiennes (Shi *et al.*, 1998).

La recherche et la comparaison subséquente de SNP spécifiques par des méthodes d'épidémiologie moléculaire permettent des analyses pointues au niveau génotypique (MacCannell, 2013). Il s'agit, ni plus ni moins, de caractériser et d'établir un profil génétique unique à chaque souche. Par conséquent, selon le niveau de similarité génétique que présentent deux isolats distincts, il est possible de conclure sur leur origine clonale et savoir s'ils appartiennent à la même souche ou s'ils représentent des souches différentes (Shi *et al.*, 1998). En associant les informations génotypiques avec des situations cliniques, des résistances aux antibiotiques, des emplacements géographiques, des niches écologiques ou encore des caractéristiques propres à l'hôte de l'infection, il devient alors possible de mieux comprendre l'impact des variations génotypiques sur la dynamique infectieuse d'une maladie (Feil & Enright, 2004). On peut ainsi dégager un portrait global de la situation épidémiologique et mettre en évidence les facteurs de risques qui lui sont associés (Foxman & Riley, 2001).

C'est d'ailleurs grâce à l'épidémiologie moléculaire qu'il a été possible de trouver l'origine de la souche de *V. cholerae* responsable de l'épidémie de choléra, qui a fait 500 000 malades et plus de 6 500 morts en Haïti en 2010 (Hendriksen *et al.*, 2011). L'enquête sanitaire a révélé que cette souche particulière de choléra venait du Népal et qu'elle avait vraisemblablement été importée sur l'île par le biais des Casques bleus népalais, déployés en renfort dans le cadre de la Mission des Nations Unies pour la stabilisation en Haïti, à la suite du tremblement de terre dévastateur du 12 janvier 2010. Plus près de nous, c'est également grâce à l'épidémiologie moléculaire que le Dr Simon Lévesque, sous la direction des Drs Eric Frost et Sophie Michaud de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke, a pu terminer avec succès ses études doctorales sur l'épidémiologie des entérites à *Campylobacter jejuni* dans la région de l'Estrie au Québec. Cela lui a permis, entre autres, de conclure que la contamination par le poulet était à l'origine de 65% des cas de campylobactériose rapportés et que les taux d'incidence significativement plus élevés en milieu rural étaient dus à une exposition accrue aux bovins (Levesque *et al.*, 2008). Cette étude d'épidémiologie moléculaire a également pu montrer que certains génotypes de *C. jejuni* étaient particulièrement associés à certaines niches écologiques (Levesque *et al.*, 2008). L'épidémiologie moléculaire a également permis d'avoir une meilleure compréhension des origines géographiques et de la distribution des génotypes

viraux pour le VHC (Fang *et al.*, 1997). Il s'agit là que de trois exemples parmi plusieurs.

### 1.5.2 Techniques d'amplification et de détection des acides nucléiques

Que ce soit pour le génotypage, la détection de résistance ou l'évaluation de la charge bactérienne, les méthodes moléculaires sont basées sur l'amplification, la détection et l'analyse de la séquence des acides nucléiques.

#### 1.5.2.1 Réaction d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence que l'amplification n'est pas mesurée à la fin, mais tout au long de la réaction (Exner, 2012). En fait, après chacun des cycles d'amplification, la quantité d'ADN produit est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, dont l'émission du signal de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction (Poitras & Houde, 2012).

Il existe deux types de marqueur fluorescent: les agents intercalant et les sondes nucléotidiques (Exner, 2012). Les agents intercalant sont peu fluorescents à l'état libre, mais lorsqu'ils s'insèrent entre les bases appariées de l'ADN double brin, ils émettent de la fluorescence détectable par l'instrument (Poitras & Houde, 2012). De l'autre côté, les sondes nucléotidiques ciblent des régions spécifiques de l'ADN amplifié et se subdivisent en 4 différentes technologies. Il y a les sondes TaqMan (Holland *et al.*, 1991), Molecular Beacons (Tyagi & Kramer, 1996), FRET (Didenko, 2001) et Scorpion (Whitcombe *et al.*, 1999). Les sondes TaqMan sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorophore émetteur. Lorsqu'il est excité par une lumière à une certaine longueur d'onde, le fluorophore émetteur l'absorbe et émet à son tour une lumière d'une longueur d'onde plus longue et donc avec moins d'énergie. À l'opposé, l'extrémité 3' de la sonde TaqMan est marquée par un étouffeur, communément appelé *quencher* en anglais. Le rôle de ce dernier est de capter la fluorescence émise par le fluorophore en l'absorbant sans réémettre de lumière. Si la sonde s'hybride avec sa cible durant la PCR, elle sera hydrolysée par



l'ADN polymérase. Cette dernière digère toute sonde hybridée avec le brin d'ADN qu'elle est en train de copier durant l'étape d'élongation, grâce à une activité exonucléase présente chez la plupart des ADN polymérase. Le fluorophore et le *quencher* se retrouvent alors éloignés et la fluorescence émise par le fluorophore peut être détectée par l'instrument de PCR en temps réel. C'est ce type de sonde que nous avons employée.

Quant à elles, les sondes fonctionnant sous le principe Molecular Beacon sont également marquées à l'extrémité 5' par un fluorophore et par un *quencher* à l'extrémité 3'. Alors que la portion centrale de la sonde est complémentaire à la séquence cible d'ADN, les extrémités des sondes ont des séquences complémentaires l'une à l'autre. Cette complémentarité des extrémités fait en sorte qu'à l'état libre la sonde adopte une forme dite en épingle à cheveux. En raison de la proximité entre le fluorophore et le *quencher*, lorsque la sonde est à l'état libre, il n'y a pas d'émission de fluorescence. Par contre, la sonde s'ouvre lorsqu'elle s'hybride à sa cible et l'éloignement du fluorophore et du *quencher* permet l'émission d'une fluorescence. La lecture de la fluorescence se fait au moment de l'hybridation, puisque les sondes se détachent de la cible avant l'élongation par l'ADN polymérase. Elles ne sont donc pas dégradées durant la PCR.

La température d'hybridation des sondes et des amorces (*Melting Temperature*,  $T_m$ ) peut être estimée par des algorithmes mathématiques<sup>11</sup> qui prennent en compte les structures tridimensionnelles des sondes et des amorces, ainsi que les interactions chimiques faibles, telles que les liaisons Van der Waals et les ponts hydrogène, qui ont un impact sur la valeur exacte du  $T_m$ . Selon les conditions pour la PCR standard, le  $T_m$  de la sonde doit habituellement avoir une valeur de 10°C plus élevée que celle des amorces (Exner, 2012).

---

<sup>11</sup> DI-Nucleic Acid hybridization and melting prediction (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=dinamelt>)

#### 1.5.2.1.1 PCR Multiplexe

Plusieurs appareils de PCR en temps réel sont capables de détecter simultanément différents fluorophores durant une même analyse. Il est alors possible de développer des PCR multiplexes qui incluent plusieurs couples d'amorces et sondes spécifiques, ce qui permet d'amplifier et de détecter plusieurs ADN cibles en même temps (Exner, 2012). Les PCR multiplexes permettent de réduire considérablement le nombre de tests à effectuer et de minimiser la quantité d'échantillons nécessaire (Poitras & Houde, 2012).

#### 1.5.2.1.2 Quantification et semi-quantification

Pour quantifier un échantillon par PCR en temps réel, il faut déterminer le nombre de cycles à partir duquel le produit de la PCR est détectable, c.-à-d. le moment de la réaction où le signal d'émission de fluorescence sera significativement plus élevé que le bruit de fond. Le moment d'apparition de ce signal seuil nommé cycle seuil (*Crossing Point*, Cp) est dépendant de la quantité d'ADN cible initialement présente dans l'échantillon et de l'efficacité d'amplification. Ainsi, plus il y a d'ADN à amplifier dans l'échantillon de départ et plus le Cp est petit. Inversement, moins il y a d'ADN à amplifier dans l'échantillon et plus le Cp sera élevé (Poitras & Houde, 2012).

La PCR en temps réel permet de mesurer la quantité d'ADN cible dans un échantillon, en comparant la valeur du Cp de cet échantillon avec les valeurs de Cp de standards dont la quantité d'ADN est connue. Par contre, il est également possible de comparer de façon semi-quantitative la quantité d'ADN cible entre différents échantillons. Pour ce faire, il faut comparer entre eux les valeurs de Cp des échantillons et les classer selon qu'ils ont une charge bactérienne faible, moyenne ou élevée (Kersh *et al.*, 2013). Cette analyse semi-quantitative se base sur le principe mathématique exponentiel qui sous-tend la PCR, à savoir que s'il y a par exemple une différence de 3,3 entre les Cp de deux échantillons, celui dont le Cp est le plus petit à une quantité d'ADN cible environ 10 fois plus élevée que celui qui a le Cp le plus grand. Ainsi, sans connaître la quantité d'ADN cible dans des échantillons inconnus, nous pouvons dire par exemple que l'échantillon A à 10 fois plus d'ADN cible que l'échantillon B (différence de 3,3 Cp), mais 100 fois moins que l'échantillon C

(différence de 6,6 Cp). Les valeurs de Cp étant tributaires de l'efficacité de l'amplification, cette méthode semi-quantitative apporte un ordre de grandeur entre les différentes concertations d'ADN cible, plutôt qu'une valeur précise.

#### 1.5.2.1.3 Courbe de dénaturation

Lorsque que l'on fait de la PCR en temps réel avec un agent intercalant, il est possible de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit qui a été amplifié, et si ce produit correspond au produit attendu, en faisant une courbe de dénaturation post-PCR. À basse température, les amplicons sont double brin ce qui permet à l'agent intercalant de s'y fixer et de fluorescer. Au fur et à mesure que la température augmente, les amplicons commencent à se dénaturer et relargent par le fait même l'agent intercalant qui cesse de fluorescer (Exner, 2012). À une certaine température, qui varie en fonction de la séquence et de la longueur de l'acide nucléique, 50% des amplicon sont dénaturés. Ce point se nomme température de fusion (*Melting Temperature*,  $T_m$ ). Plus un amplicon est long, plus il faudra d'énergie pour le dénaturer et donc plus son  $T_m$  sera élevé. Cependant, le pourcentage de GC aura également un impact sur la valeur du  $T_m$ . Le nombre de liens chimiques entre les G et les C étant plus élevé que le nombre de liens entre les A et les T, le  $T_m$  sera d'autant plus élevé qu'il y a de GC dans l'amplicon (Exner, 2012).

Pour établir le  $T_m$  d'un amplicon, le logiciel d'analyse de l'instrument calcul la dérivée première de la courbe de variation de la fluorescence en fonction de la température. Cela est représenté graphiquement par un pic unique vis-à-vis une température précise. Si plusieurs pics sont observés à différentes températures ou si les pics sont décalés par rapport au  $T_m$  attendu, ceci veut dire qu'il y a présence de différents amplicons. De plus, l'amplitude du pic de  $T_m$ , c.-à-d. sa hauteur, sera proportionnelle à la longueur de l'amplicon, à la largeur du pic et au nombre de copies de cet amplicon. Comme pour les sondes et les amorces, il est possible d'estimer la

valeur de  $T_m$  à l'aide de programmes informatiques qui tiennent compte de l'environnement physico-chimique de chaque base<sup>12</sup>.

#### 1.5.2.1.4 Courbe de dénaturation à haute résolution

De la même manière que pour les courbes de dénaturation décrites ci-dessus, l'analyse du produit de la PCR par une courbe de dénaturation à haute résolution (*High Resolution Melting Curve*, HRM) est une méthode qui se base sur l'amplification par PCR d'une courte séquence d'un gène, en présence d'un colorant spécial qui émet de la fluorescence lorsqu'intercalé dans l'ADN double brin (Levesque *et al.*, 2011). Ce colorant diffère du colorant régulier utilisé dans la PCR en temps réel (SYBR Green), car il n'inhibe pas la Taq polymérase et peut être ajouté à des quantités saturantes. Une fois la PCR terminée, les amplicons sont rénatés à basse température, puis la température est augmentée très graduellement et l'appareil mesure la fluorescence plusieurs dizaines de fois par secondes. L'augmentation de la température dénature progressivement l'ADN, ce qui libère le colorant et diminue la fluorescence jusqu'à son extinction complète. Les régions riches en AT dénaturent plus rapidement que les régions riches en GC. La dénaturation progressive crée un patron de dénaturation unique, sous forme d'une courbe calculée à partir de la dérivée seconde de la fluorescence en fonction de la température. S'il y a des variations génétiques entre les séquences analysées, le patron sera modifié. Le HRM est une méthode possédant une sensibilité très élevée, car elle permet de distinguer des fragments de 100 à 300 paires de bases (pb) qui ne diffèrent entre eux que par une seule base.

#### 1.5.2.2 Réaction d'amplification en chaîne nichée par polymérase

Malgré l'importante sensibilité intrinsèque de la PCR, il est possible de l'accroître davantage en employant une stratégie dite de PCR nichée (Lan *et al.*, 1994). Il s'agit là de deux PCR successives, où un sous-fragment du produit de la première réaction est amplifié dans une seconde réaction. La première réaction est appelée PCR externe, alors que la deuxième se nomme PCR interne (la PCR interne employant un couple

---

<sup>12</sup> DI-Nucleic Acid hybridization and melting prediction (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=dinamelt>)

d'amorces qui cible une région interne à celle ciblée par le couple d'amorces de la PCR externe).

La PCR nichée permet l'enrichissement des échantillons en ADN cible, particulièrement lorsque l'ADN cible est en faible concentration par rapport à l'ADN total (Lan *et al.*, 1994). Lors d'une PCR à une étape, l'amplification des ADN en faible quantité est parfois masquée par l'amplification de produits d'amplification non spécifiques. La PCR nichée offre alors la possibilité d'obtenir des produits d'amplification plus purs. De même, lorsque l'ADN cible correspond à une région hautement conservée entre les différentes espèces microbiennes, comme c'est le cas avec les gènes codant pour les ARN ribosomiaux, il est avantageux de faire une PCR nichée pour améliorer la spécificité de la réaction, puisque les produits amplifiés doivent avoir une homologie avec les quatre amorces.

### **1.5.3 Techniques de typage moléculaire**

Les techniques de génotypage, ou de typage moléculaire, se divisent en deux catégories: celles qui tracent une épidémiologie à court terme lorsqu'il est question d'investigation d'éclosion d'étiologie infectieuse, versus celles qui décrivent une épidémiologie à long terme où l'origine des génotypes, leur évolution et leur diversité sont étudiées (MacCannell, 2013).

#### **1.5.3.1 Électrophorèse en champ pulsé**

La technique d'épidémiologie à court terme la plus discriminante est l'électrophorèse en champ pulsé (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (MacCannell, 2013). Le principe de cette technique consiste à digérer l'ensemble du génome de la bactérie analysée et à séparer les fragments en les faisant migrer dans un gel d'agarose dont l'orientation du champ électrique change alternativement durant la migration. À chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ et ce temps de réorientation est proportionnel à la taille de la molécule. Une fois la migration terminée, on obtient un profil de migration spécifique à chaque génotype d'une même espèce.

### 1.5.3.2 Le typage de séquence en loci multiples

Le système MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) est une technique d'épidémiologie à long terme (Urwin & Maiden, 2003). Il repose sur le séquençage d'une portion d'environ 500 pb de 7 gènes métaboliques (*Housekeeping genes*) préalablement amplifiés par PCR. Ces gènes sont spécialement choisis afin qu'ils soient très peu, ou pas soumis, à la pression de sélection du milieu. Un numéro d'allèle unique est attribué à chacune des variations de séquence d'un même gène, et ce, même s'il n'y a qu'une seule paire de bases de différence entre deux allèles. Des profils alléliques sont ensuite établis pour chacun des spécimens analysés, en regroupement les numéros attribués à chacune de ses allèles. La comparaison des différentes séquence-type (ST) ainsi formées permet de regrouper en complexes clonaux tous ceux qui ne diffèrent pas plus que par 3 allèles. Ces complexes clonaux s'organisent autour d'un ancêtre commun appelé génotype central, à partir duquel ont évolué les autres génotypes membres du complexe. C'est donc dire qu'un complexe clonal est un regroupement d'isolats non identiques, mais liés par un ancêtre commun. Le MLST est une méthode de typage relativement récente, développée, entre autres, pour l'étude des populations de *C. jejuni*, de *Neisseria meningitidis*, de *Streptococcus pneumoniae* et de *Staphylococcus aureus* et maintenant appliquée à un grand nombre d'autres organismes<sup>13</sup>.

### 1.5.3.3 L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction

L'analyse du polymorphisme dans la longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (Frost *et al.*, 1991) est basée sur la modification des sites de restriction dans la séquence des gènes due à la présence de SNP. Cela a pour conséquence de faire varier la taille des fragments lorsqu'il y a digestion par des enzymes de restriction. Partant de ce principe, le gène cible est d'abord amplifié par PCR et le produit est ensuite digéré par des enzymes de restriction spécifiques. La variation dans la taille des fragments de restriction est visualisée par électrophorèse sur gel, ce qui permet d'établir le génotype par visualisation du patron de digestion.

---

<sup>13</sup> Système de typage MLST (<http://www.mlst.net/>)

## 1.6 Hypothèse de recherche pour expliquer les cas d'échec de traitement

Il est entendu que des cas d'échec de traitement peuvent être causés par une réinfection du patient lors de contacts sexuels post-antibiothérapie avec un partenaire infecté. Il peut s'agir alors du même partenaire qui a causé l'infection initiale (si ce dernier est infecté et non traité ou si son traitement n'est pas encore complet) ou d'un nouveau partenaire infecté. L'effet n'est pas immédiat lorsqu'un patient est sous antibiothérapie. Il s'écoule quelques jours avant que le traitement produise un effet définitif et durant lesquels le patient demeure contagieux (ASPC, 2008). Ainsi, un patient guérit, et donc qui a réussi son traitement, peut se réinfecter s'il n'est pas vigilant. Il peut y avoir également d'autres cas d'échec de traitement, s'il y a par exemple un non-respect de l'antibiothérapie. Bien que la thérapie recommandée par la santé publique au Canada consiste à une seule dose d'azithromycine (ASPC, 2008), il est possible qu'un patient ait une mauvaise absorption de l'antibiotique (Hocking *et al.*, 2013) ou présente une immunodépression qui accroît sa susceptibilité vis-à-vis de l'infection (Luebke *et al.*, 2004). Ce sont là des facteurs liés à l'hôte et à son environnement.

Malgré tout, il est possible que des causes bactériennes puissent être responsables des cas d'échec de traitement de la chlamydie génitale. Premièrement, au niveau de l'infection, la charge bactérienne de départ peut être plus élevée chez un patient par rapport à un autre. Comme les corps élémentaires sont naturellement résistants aux antibiotiques puisqu'ils sont métaboliquement inactifs (Binet & Maurelli, 2005), la vitesse d'élimination de l'antibiotique peut être plus rapide que la vitesse d'élimination des corps élémentaires. Avec une charge bactérienne élevée, il y a donc plus de risques que l'antibiotique ne puisse pas éliminer complètement l'infection. Il est également possible que des souches particulières de *C. trachomatis* soient plus aptes à adopter un état de persistance, permettant plus facilement à la bactérie de se protéger des antibiotiques et aussi d'échapper à la réponse immunitaire. Finalement, l'émergence de résistance aux antibiotiques doit être prise en considération, car bien que l'antibiothérapie actuelle soit efficace, l'utilisation presque exclusive d'azithromycine pour traiter la chlamydie génitale peut mener au développement de résistance. Le fait qu'il est très difficile d'évaluer la résistance de *C. trachomatis* aux antibiotiques, et que

cela est rarement effectué, fait en sorte que l'apparition de résistance pourra passer longtemps inaperçue. Couplé à un phénomène de persistance accrue, ceci pourrait caractériser des souches responsables d'infections chroniques et d'échec de traitement.

### **1.6.1 Lien entre le génotype et les cas d'échec de traitement et d'infection persistante**

#### 1.6.1.1 Application de l'épidémiologie moléculaire à la chlamydie génitale

Dans le cas des échecs de traitement de la chlamydie génitale et des infections persistantes, nous voulons déterminer si un certain génotype de la bactérie aurait développé une capacité accrue à entrer en état de persistance, à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte ou à résister au traitement antibiotique. Cette hypothèse se base sur l'observation chez d'autres espèces bactériennes de l'émergence de certaines caractéristiques infectieuses associées spécifiquement à un génotype particulier. C'est notamment le cas chez *S. aureus* avec la résistance à la méthicilline (SARM) (Enright, 2003) et l'accroissement de la résistance à l'oxacilline (BORSA) (Zierdt *et al.*, 1992), chez les pneumocoques hautement résistants à la pénicilline (Shi *et al.*, 1998) et chez *Clostridium difficile* épidémique (NAP1/027) (Killgore *et al.*, 2008).

De plus, la découverte fortuite en Suède en octobre 2006 d'un nouveau variant de *C. trachomatis*, qui a pris par surprise la santé publique mondiale, est venue renforcer l'idée qu'il est possible que de nouvelles souches de *C. trachomatis* émergent (Ripa & Nilsson, 2006). Baptisé nvCT (*New Variant of Chlamydia trachomatis*) ce nouveau variant se caractérise par une délétion de 377 pb dans la séquence du plasmide cryptique présent dans la bactérie (Ripa & Nilsson, 2007). Ce plasmide de 7500 pb est commun à tous les génotypes de *C. trachomatis* et présent en environ 4 copies (Pickett *et al.*, 2005). L'impact de cette délétion est significatif, car il s'agit de la cible moléculaire de deux des trois tests commerciaux d'amplification des acides nucléiques les plus employés dans le monde pour la détection clinique de la bactérie, soit le Abbott m2000 (Abbott Laboratories) et le AMPLICOR CT/NG Test (Roche Diagnostics) (Ripa & Nilsson, 2007).



Il a fallu un certain temps avant que le nvCT soit mis en évidence par le ProbeTec ET (Becton Dickinson) un test moins employé en Suède, mais dont la cible moléculaire est différente de celle des tests d'Abbott Laboratories et de Roche Diagnostics (Herrmann *et al.*, 2008). Ce délai a fait en sorte que les patients infectés par le nvCT n'ont pas reçu de diagnostic de chlamydie génitale et conséquemment n'ont pas reçu de traitement antibiotique (Unemo & Clarke, 2011). Cet avantage a grandement facilité la transmission du nvCT dans la population suédoise, au point où lorsqu'il a été découvert, l'infection par le nvCT représentait 64% des cas de chlamydie génitale (Unemo & Clarke, 2011). Néanmoins, cette caractéristique du nvCT est restée confinée à un seul sous-type du génotype E (Seth Smith *et al.*, 2009), indiquant que cet avantage phénotypique (aussi appelé avantage de sélection) n'a pas pu se transmettre aux autres génotypes. C'est d'ailleurs ce qui a été observé par rapport aux caractéristiques infectieuses qui sont aussi demeurées restreintes à certains génotypes bien particuliers dans le cas du SARM (Enright, 2003), du BORSA (Zierdt *et al.*, 1992), des pneumocoques hautement résistants à la pénicilline (Shi *et al.*, 1998) et du *C. difficile* épidémique (Killgore *et al.*, 2008).

De cette manière, s'il y a émergence de nouvelles souches de *C. trachomatis* nous escomptons donc qu'il y aura un enrichissement d'un génotype particulier, d'autant plus s'il s'agit d'un variant présentant une capacité accrue à entrer en état de persistance. Une telle situation impliquerait par définition une réduction du métabolisme et une diminution du taux de reproduction. Une caractéristique qui ne peut pas se transmettre facilement et qui restera, de toute évidence, confinée à un seul sous-type d'un génotype donné.

## **1.6.2 Développement de résistance chez *C. trachomatis***

### **1.6.2.1 Généralités sur les modes d'action des antibiotiques et les mécanismes de résistance**

Un antibiotique est une substance naturelle ou synthétique qui possède la capacité d'interférer avec la croissance des microorganismes. Les différentes familles

d'antibiotiques se divisent en 5 grandes classes selon leur mode d'action (van Hoek *et al.*, 2011). Il y a ceux qui inhibent la synthèse de la paroi de peptidoglycane (bêta-Lactamines, glycopeptides et fosfomycine), ceux qui altèrent l'intégrité de la membrane cellulaire (polymyxines et gramicidines-Tyrocidine), ceux qui perturbent le métabolisme bactérien (sulfamides, sulfones et triméthoprime), ceux qui inhibent de la synthèse des acides nucléiques (quinolones et fluoroquinolones, rifamycine, nitro-imidazolée et nitrofurane) et finalement ceux qui inhibent la synthèse des protéines (aminoglycosides, macrolides-lincosamides-streptogramin, cyclines et phénicolés).

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques à l'aide de différents mécanismes (van Hoek *et al.*, 2011). Elles peuvent diminuer leur perméabilité membranaire, refouler les antibiotiques avec des pompes à efflux, les inactiver à l'aide d'enzymes, modifier la cible de l'antibiotique au niveau cellulaire ou encore introduire des mutations dans le gène qui code la cible. Ce dernier stratagème repose sur la présence de SNP dans les gènes bactériens et est un mécanisme important d'acquisition de résistance aux antibiotiques (van Hoek *et al.*, 2011).

#### 1.6.2.2 Traitement de la chlamydie génitale

Le traitement empirique prescrit pour traiter la chlamydie génitale consiste en une monodose de 1 g d'azithromycine *per os* (ASPC, 2008). L'azithromycine fait partie de la famille des macrolides, mais plus précisément de la sous-famille des azalidés. De la même manière que l'érythromycine, dont elle est un dérivé, l'azithromycine se fixe sur l'ARN ribosomal de 23S (ARNr 23S) de la sous-unité 50S du ribosome. Elle agit alors en bloquant la translocation du ribosome et empêche l'élongation de la chaîne peptidique. Ceci a pour effet d'inhiber la synthèse protéique et d'arrêter le métabolisme bactérien.

Comme tous les macrolides, l'azithromycine est chimiquement composé d'un anneau macrocyclique lactone, auquel sont fixés deux molécules de sucres: le desoamine et le cladinose. La structure chimique de l'azithromycine est identique à celle de l'érythromycine, à la différence près que dans la molécule d'azithromycine l'un

des atomes de carbone de l'anneau macrocyclique lactone est substitué par atome d'azote. D'où la classification l'azithromycine comme un macrolide azalidé. Cette modification structurelle confère à l'azithromycine une meilleure stabilité en condition acide, augmente son absorption orale, produit moins d'inconforts gastro-intestinaux et augmente son spectre d'action. En plus d'être efficace contre *C. trachomatis*, l'azithromycine présente une activité accrue contre les bactéries à Gram négatif tel que *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., *C. jejuni*, *V. cholerae*, *N. gonorrhoeae* et *Helicobacter pylori*. L'azithromycine est également efficace contre les pneumocoques sensibles à l'érythromycine, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis* et les pathogènes respiratoires atypiques comme *Legionella pneumophila*, *C. pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae*. L'azithromycine est généralement recommandé pour le traitement de la chlamydie génitale et des infections pulmonaires acquises en communauté. C'est d'ailleurs un des antibiotiques de choix dans le traitement des infections à *Mycobacterium avium* chez les patients sidatiques. Au niveau pharmacocinétique, l'azithromycine a une plus grande demi-vie que l'érythromycine et possède une meilleure distribution tissulaire et pénétration cellulaire.

#### 1.6.2.3 Mécanisme commun de résistance entre *C. jejuni* et *C. trachomatis*

Malgré le fait que le traitement antibiotique de la chlamydie génitale soit efficace (ASPC, 2008), l'utilisation quasi exclusive de l'azithromycine crée une pression de sélection qui peut aboutir à l'émergence de résistance (van Hoek *et al.*, 2011). Des mutations causées par des SNP dans la région peptidyl transférase du gène de l'ARNr 23S ont été identifiées comme l'une des rares causes de résistance aux macrolides chez *C. trachomatis* (Misyurina *et al.*, 2002). Toutefois, au niveau du monde bactérien, ce mécanisme est une cause importante d'acquisition de résistance cliniquement significative aux macrolides chez certaines bactéries comme *C. jejuni* (Iovine, 2013). Or, grâce aux recherches doctorales du Dr Lévesque, le laboratoire du Dr Frost possède l'une des plus importantes banques de souches cliniques, vétérinaires et environnementales au monde pour cette bactérie (Levesque *et al.*, 2008). L'accès à un grand nombre de spécimens de *C. jejuni*, dont le profil de résistance est connu, nous permettra de mettre au point une méthode

moléculaire de détection de SNP de résistance. Une méthode qui pourra ensuite être adaptée afin de détecter ce même mécanisme de résistance chez *C. trachomatis*.

#### 1.6.2.3.1 La campylobactériose en bref

La campylobactériose est une entérite d'origine animale (zoonose alimentaire) dont le principal agent causal est *C. jejuni* (Altekruse *et al.*, 1999). Cette maladie aiguë et de gravité variable dure en moyenne 10 jours et est caractérisée par des symptômes tels que la diarrhée (souvent sanglante), les douleurs abdominales, de la fièvre, de l'asthénie et des vomissements (Levesque *et al.*, 2011). La campylobactériose est la première cause d'infections intestinales bactériennes dans le monde (Zilbauer *et al.*, 2008) et représente la 4<sup>e</sup> maladie à déclaration obligatoire la plus rapportée au Canada (Levesque *et al.*, 2011).

On retrouve majoritairement *C. jejuni* dans le tractus gastro-intestinal des volailles et des bovins (Altekruse *et al.*, 1999), ainsi que dans l'environnement et les eaux de surface contaminées par leurs matières fécales (Altekruse *et al.*, 1999). La transmission à l'homme se fait essentiellement par l'ingestion d'aliments contaminés, comme la volaille (Allos, 2001) et lait cru (Michaud *et al.*, 2004), ainsi que par l'eau non adéquatement traitée (Michaud *et al.*, 2004). La contamination croisée lors de l'entreposage et de la préparation des aliments est également une source de transmission (Altekruse *et al.*, 1999).

L'infection guérie généralement de façon spontanée après quelques jours (Guerrant *et al.*, 2001). Toutefois, pour réduire la durée de la maladie chez les personnes très malades et chez celles à risque de développer des complications, un traitement antibiotique à l'érythromycine ou à la ciprofloxacine est fréquemment offert (Guerrant *et al.*, 2001).

#### 1.6.2.3.2 Résistance aux macrolides

Chez *C. jejuni*, la mutation dans la région peptidyl transférase du gène de l'ARNr 23S consiste en la substitution d'une adénine par une guanine à la

position 2075 (A2075G) (Vacher *et al.*, 2005). Cela provoque un changement de conformation du ribosome, ce qui modifie le site de liaison allostérique des macrolides et bloque l'action de l'antibiotique. Toutefois, cette mutation n'affecte pas la capacité du ribosome à diriger la synthèse protéique. Chez des spécimens cliniques de *C. trachomatis*, on parle d'une mutation dans la même région, soit la substitution d'une adénine par une cytosine à la position 2058 (A2058C) (Misyurina *et al.*, 2004). Dans une moindre mesure, la substitution d'une cytosine par une thymine à la position 2611 (C2611T) est également évoquée (Misyurina *et al.*, 2004).

Outre ce mécanisme de résistance, nous retrouvons chez d'autres espèces bactériennes, notamment chez les staphylocoques (Piatkowska *et al.*, 2012) et les streptocoques (Reinert, 2009), le gène *mef* (*macrolides efflux*) qui code pour une pompe à efflux et le gène *erm* (*Erythromycine Resistance Methylation*) qui code pour une méthylase ribosomal. Au même titre que les SNP de résistance qui provoquent un encombrement stérique au site de liaison des macrolides, la méthylation du résidu spécifique d'adénine à la position 2075 par la méthylase ribosomal bloque également le site de liaison des macrolides (Iovine, 2013). Il s'agit là de deux stratégies différentes pour atteindre le même objectif.

#### 1.6.2.3.3 Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont une importante classe d'antimicrobien (Yamane *et al.*, 2007) qui se décline en 4 générations et dont le mode d'action général consiste à inhiber la synthèse des acides nucléiques (Almeida *et al.*, 2007). Avec les bêta-lactames, les fluoroquinolones représentent les deux classes d'antibiotiques les plus utilisées en médecine (Appelbaum & Hunter, 2000). Les fluoroquinolones sont des antibiotiques synthétiques (Appelbaum & Hunter, 2000) possédant un noyau quinolone, auquel a été ajouté un atome de fluor. Cet atome de fluor procure un large spectre d'action aux fluoroquinolones en comparaison aux quinolones (Bassetti *et al.*, 2001). Les fluoroquinolones sont très efficaces contre la plupart des entérobactéries et des coques à Gram négatif (Bassetti *et al.*, 2001), mais elles ont une activité plus limitée chez sur les bactéries à Gram positif (Appelbaum & Hunter, 2000). Ainsi, les fluoroquinolones servent de traitement de première ligne pour les infections

urinaires et des diarrhées bactériennes (de Almeida *et al.*, 2007) et de traitement alternatif pour les infections transmissibles sexuellement et certaines infections respiratoires (de Almeida *et al.*, 2007). Ayant plusieurs autres applications cliniques, les fluoroquinolones servent aux traitements d'un très grand nombre d'autres infections (Tran *et al.*, 2005).

L'activité antibiotique des fluoroquinolones est due à l'inhibition de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (Ba *et al.*, 2006). Ces deux enzymes sont impliquées dans le maintien de l'état topologique de l'ADN (Tran *et al.*, 2005). L'ADN gyrase est un tétramère composé de 2 sous-unités A (GyrA) et de deux sous-unités B (GyrB) (Tran *et al.*, 2005). Son rôle est d'introduire un surenroulement négatif dans l'ADN et de relâcher les tensions qui s'accumulent en amont du complexe de transcription et de réplication (Drlica, 1999). C'est donc une enzyme essentielle dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN (de Almeida *et al.*, 2007) et à la condensation du chromosome (Tran *et al.*, 2005). Pour sa part, la topoisomérase IV est également un tétramère, mais composé des sous-unités ParC et ParE (Ba *et al.*, 2006). Elle est plutôt responsable de la séparation des concatémères produits lors de la réplication de l'ADN (Drlica, 1999), ce qui facilite la séparation du matériel génétique durant la division cellulaire (de Almeida *et al.*, 2007). Les fluoroquinolones ciblent préférentiellement l'ADN gyrase chez les bactéries à Gram négatif et la topoisomérase IV chez les bactéries à Gram positif (Tran *et al.*, 2005).

Il existe différents mécanismes de résistance contre les fluoroquinolones. Les mutations dans la région *Quinolone Resistance-Determining Regions* (QRDR) des gènes codant pour l'ADN gyrase (*gyrA*) et la topoisomérase IV (*parC*), représentent le mécanisme le plus important (Perichon *et al.*, 2007). Chez *C. jejuni*, il s'agit d'une mutation dans la région QRDR du gène *gyrA*, causant la substitution d'une cytosine par une thymine à la position 257 (C257T) (Iovine, 2013). Ce changement de nucléotide provoque à son tour une substitution de l'acide aminé thréonine par une isoleucine à la position 86 de la sous-unité A de l'ADN gyrase (Vacher *et al.*, 2005). Bien que cela ne nuise pas au rôle de l'enzyme, le changement d'acide aminé modifie l'encombrement stérique au site de liaison de la ciprofloxacine et l'empêche d'inhiber la réplication de l'ADN (van Hoek *et al.*, 2011).

Des mutations dans le gène *gyrB* de l'ADN gyrase et *ParE* de la topoisomérase IV peuvent aussi conférer une résistance (Ince & Hooper, 2001). De plus, il existe aussi des pompes à efflux comme la pompe *NorA* de *S. aureus* (Yamane *et al.*, 2007) et *QepA* de *E. coli* (Yamane *et al.*, 2007) qui confèrent une résistance aux fluoroquinolones (Yamane *et al.*, 2007). Finalement, la modification de l'antibiotique par l'acétylation causé par un aminoglycoside acétyltransférase (Robicsek *et al.*, 2006) et la protection de la cible par le pentapeptide *Qnr* (Tran *et al.*, 2005), figurent parmi les mécanismes connus de résistance aux fluoroquinolones.

#### 1.6.2.4 Détection de résistances chez *C. trachomatis*

Le calcul de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est une méthode largement reconnue pour évaluer la résistance aux antibiotiques. Elle permet de connaître la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle la bactérie cesse de croître (Misyurina *et al.*, 2004). Dépendamment de la valeur de la CMI et en fonction de l'antibiotique testé, il est possible d'établir s'il y a sensibilité ou résistance.

Bien que les méthodes actuelles de détermination de la sensibilité aux antibiotiques basées sur la CMI soient précises, elles ne sont pas très rapides et n'identifient pas le mécanisme de résistance impliqué. De plus, dû au caractère intracellulaire obligatoire de *C. trachomatis*, l'évaluation de son profil de résistance se fait traditionnellement en exposant des cultures cellulaires infectées à différentes concentrations d'antibiotiques (Ljubin-Sternak *et al.*, 2013). De plus, la CMI pour un même antibiotique peut varier dépendamment de la lignée cellulaire employée pour la culture (Wang *et al.*, 2005). Or, en toute logique, il est impossible d'intégrer à la routine d'un laboratoire clinique des méthodes d'évaluation de la CMI reposant sur des cultures cellulaires, d'autant plus que les prélèvements uro-génitaux de chlamydie génitale sont acheminés aux laboratoires dans un milieu de transport qui lyse les cellules. Il est donc impossible de mettre en culture les chlamydies qu'ils contiennent. Il faut donc se tourner vers les tests moléculaires de détection de résistance aux antibiotiques. Toutefois, de tels tests appliqués à la chlamydie génitale ne sont pas encore disponibles pour le diagnostic. Résultat, aucun laboratoire clinique n'offre l'évaluation du profil de résistance pour cette bactérie et les médecins prescrivent presque

qu'exclusivement de l'azithromycine pour le traitement. Des conditions fertiles à l'émergence de résistance (van Hoek *et al.*, 2011)!

Le développement de résistance chez *C. trachomatis* n'est pas clair. Différents auteurs ont décrit un phénomène de résistance hétérotypique, c.-à-d. que seulement une fraction de la population bactérienne présenterait une capacité à résister à l'azithromycine (Jones *et al.*, 1990; Somani *et al.*, 2000; Bhengraj *et al.*, 2010). Cela serait alors observable dans un grand inoculum, mais inapparent si l'analyse est faite sur un petit nombre de bactéries. À ce jour, seuls quelques cas cliniques d'échec de traitement ont pu être associés à une résistance à l'azithromycine, sans que le mécanisme de résistance soit identifié (Horner, 2006). Nous avons donc poussé nos recherches vers des méthodes moléculaires ciblant les SNP A2058C et C2611T, présentés comme des causes probables de résistance chez *C. trachomatis* (Misyurina *et al.*, 2004). Grâce à notre grand échantillon de prélèvements positifs de chlamydie génitale, nous espérons pouvoir détecter cette résistance ou à tout le moins, établir un lien entre un génotype particulier et un état de persistance réfractaire à l'action des antibiotiques.

Par contre, un problème rencontré avec les PCR faites à partir de prélèvements cliniques est qu'ils sont polymicrobiens, notamment lorsqu'il s'agit de prélèvements urogénitaux, où la flore microbienne est complexe et abondante. De plus, dans le cas de chlamydie génitale, les chlamydies se retrouvent en faible quantité en comparaison des autres microorganismes présents. Dans ce contexte, nous avons donc opté pour une stratégie basée sur la PCR nichée (Frost *et al.*, 1993).

### **1.6.3 Charge bactérienne initiale**

Comme mentionné précédemment, lorsque les chlamydies sont sous la forme de corps élémentaire ou en état de persistance, elles sont naturellement résistantes aux antibiotiques comme l'azithromycine. C'est seulement lors de la multiplication intracellulaire des chlamydies, alors qu'elles sont sous forme de corps réticulé, que l'azithromycine a un effet.



Toutefois, si la charge bactérienne est élevée, le taux d'élimination des corps réticulés par l'azithromycine peut être plus bas que la vitesse à laquelle ils se transforment en corps élémentaires résistants. Le délai qui s'écoule avant que ces nouveaux corps élémentaires infectent des cellules peut être suffisant à ce que la concentration tissulaire de l'azithromycine tombe en dessous de la CMI. S'il y a une charge bactérienne élevée, et considérant que le traitement à l'azithromycine est à dose unique, il est possible de croire qu'un nombre suffisant de chlamydies puissent survivre au traitement antibiotique et maintenir une infection post-antibiothérapie. Il s'agirait alors d'un échec de traitement et l'administration de l'antibiotique devrait être répétée.

D'autre part, comme la chlamydie génitale est bien souvent asymptomatique, elle n'est pas traitée puisque les personnes infectées ne ressentent pas les symptômes qui les amèneraient à consulter. L'infection peut donc remonter sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois, le tractus uro-génital. Les risques de progression seront alors plus élevés s'il s'agit d'une infection avec une charge bactérienne importante. Ultiment, le système immunitaire pourra éliminer l'infection (Geisler, 2010), mais cela prendra plus de temps si la charge bactérienne est importante.

#### 1.6.3.1 Évaluation de la charge bactérienne

Habituellement, la mesure de la charge bactérienne d'un échantillon est effectuée par un dénombrement des bactéries cultivables. Pour ce faire, il suffit de procéder à une dilution en série de l'échantillon et à déposer un volume connu de chacune des dilutions sur une gélose qui sera incubée. Après incubation à température constante, on observe sur le milieu des colonies bactériennes ou chaque colonie provient d'une Unité formatrice de colonies (UFC) (On considère que chaque colonie est issue d'une cellule bactérienne). En connaissant le volumeensemencé et son facteur de dilution, il est possible de calculer la charge bactérienne de l'échantillon initiale. Mais encore là, la lyse des chlamydies dans le milieu de transport ne permet pas d'évaluer la charge bactérienne du prélèvement par la méthode de dénombrement des bactéries cultivables. Par ailleurs, même si les chlamydies n'étaient pas lysées, cette méthode s'applique très difficilement à la croissance sur cultures cellulaires requise par les intracellulaires obligatoires (Borges *et al.*, 2013).

Une alternative consiste plutôt à évaluer la quantité d'une bactérie particulière dans un échantillon, en amplifiant sélectivement une séquence d'acide nucléique qui lui est propre et en la quantifiant (voir section 1.5.1.1.1). En comparant ce résultat à des échantillons de références, il est possible d'établir la charge bactérienne de l'échantillon. On peut également évaluer la charge bactérienne d'un échantillon de façon semi-quantitative (Kersh *et al.*, 2013). Dans ce cas, il faut plutôt comparer les échantillons entre eux, afin de conclure par exemple qu'un échantillon donné a une charge bactérienne 10 fois plus importante qu'un autre. Ceci offre une façon simple et rapide de classer différents échantillons selon qu'ils aient une charge bactérienne faible, moyenne ou élevée. Ce type d'évaluation semi-quantitative se prête bien à des études d'observations, lorsqu'on cherche par exemple un lien associatif entre des charges bactériennes élevées et des situations cliniques particulières, qui ne se retrouvent pas lorsque la charge bactérienne est plus faible. C'est précisément l'approche qui a été choisie afin d'explorer un lien potentiel entre une charge bactérienne élevée et les cas d'échec de traitement de la chlamydie génitale.

## 1.7 Objectifs du projet de recherche

À la lumière des hypothèses présentées et considérant un programme de formation en microbiologie, l'objectif général de ce projet de recherche a été de mieux comprendre les causes bactériennes des échecs de traitement de la chlamydie génitale. Plus précisément, les travaux décrits dans ce mémoire ont eu pour objectifs de:

- 1) Développer une méthode de diagnostic moléculaire par PCR en temps réel, afin de détecter une résistance cliniquement significative à l'azithromycine chez *C. trachomatis*;
- 2) Déterminer s'il y a une corrélation entre la charge bactérienne et l'une ou l'autre des situations cliniques d'échec de traitement, de réinfection ou de persistance;
- 3) Déterminer si un génotype particulier est associé plus fréquemment à l'une ou l'autre des situations cliniques d'échec de traitement, de réinfection ou de persistance.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Liste des amorces et des sondes

Séquences des amorces et des sondes employées dans les expériences de PCR décrites subséquemment et visant la détection de résistances à l'érythromycine (23S) et à la ciprofloxacine (*gyrA*) dans les spécimens de *C. jejuni* (CJ); ainsi que la détection de résistances à l'azithromycine (23S), le génotypage (*ompA*) et la quantification de la charge bactérienne (PC) des spécimens de *C. trachomatis* (CT).

AMORCES	CIBLES		SÉQUENCES
CampS-F	23S	CJ	5'- AGC ATT AGC GAA GCT CTT GAT -3'
CampA-R	23S	CJ	5'- CCT CCC ACC TAT CCT GCA C- 3'
Cam23S1986F	23S	CJ	5'- ATG GCG TAA CGA GAT GGG AG -3'
Cam23S2117R	23S	CJ	5'- CCA AGT AGC AGT GTC AAG C -3'
CamGyr432F	<i>gyrA</i>	CJ	5'- GCT ATG CAA AAT GAT GAG GC -3'
CamGyr664R	<i>gyrA</i>	CJ	5'- CAG TAT AAC GCA TCG CAG CG -3'
Ct23s1985A.F	23S	CT	5'- ACT CGG TGA AAT TGT AGT AG -3'
Ct23s2823.R	23S	CT	5'- ACT GTG CTT ACA CCT CCA AC -3'
Ct23s2001B.F	23S	CT	5'- GTA GCA GTG AAG ATG CTG TTT ACC -3'
Ct23s2683.R	23S	CT	5'- CAA AAC AAC CGA TAC ACC ATT GG -3'
Ct23s2528.F	23S	CT	5'- TTG GCT GTT CGC CAA TTA AAG CGG 3'
Ct23s2105.R	23S	CT	5'- CCT GGC TAT CCT ACA CAT AAC AAA CC -3'
EF93_ompA-1	<i>ompA</i>	CT	5'- ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG G -3'
EF93_ompA-2	<i>ompA</i>	CT	5'- GAT TTT CTA GAY TTC ATY TTG -3'
EF93_ompA-3	<i>ompA</i>	CT	5'- GGG AAT CCT GCT GAA CCA AG -3'
EF93_ompA-4	<i>ompA</i>	CT	5'- AAT TGC AAS GAR ACG ATT TG -3'
CP 24	PC	CT	5'- GGG ATT GTA ACA ACA AGT CAG G -3'
CP27	PC	CT	5'- CCT CTT CCC CAG AAC AAT AAG AAC AC -3'

CT (*C. trachomatis*) CJ (*C. jejuni*) PC (Plasmide cryptique)

SONDES	CIBLES		SÉQUENCES
Camp23SWT-FAM	23S	CJ	5'-/56-FAM/ CGG CAA GAC GGA AAG ACC /IBFQ/-3'
Camp23SMut-TEX615	23S	CJ	5'-/TEX615/ CGG CAA GAC GGA GAG ACC /IBFQ/-3'
CampGyrWT-FAM	23S	CJ	5'-/56-FAM/ CAT GGA GAT ACA GCA GTT TAT GAT /IBFQ/-3'
CampGyrWT-HEX	gyrA	CJ	5'-/HEX/ CAT GGA GAT ACA GCA GTT TAT GAT /IBRQ/-3'
CampGyrMut-TYE665	gyrA	CJ	5'-/TYE665/ CAT GGA GAT ATA GCA GTT TAT GAT /IBRQ/-3'
Ct23R2076HEX	23S	CT	5'-/HEX/ AAG GTT CAC GGG GTC TTT TCG TCC TTT CGC G /3iABkFQ/-3'
Ct23R2632RFAM	23S	CT	5'-/56-FAM/ ACA GTT TGG TCT CTA TCC TTC GTG GGC /3iABkFQ/-3'
CP IDT-A FAM	PC	CT	5'-/56-FAM/ CGCTTG CAC GAA GTA CTC TGG GA /3iABkFQ/-3'

CT (*C. trachomatis*) CJ (*C. jejuni*) PC (Plasmide cryptique)

## 2.2 Détection moléculaire de résistances chez *C. jejuni*

La première étape du projet a été de développer une méthode de diagnostic moléculaire, afin de détecter les potentiels SNP de résistance à l'azithromycine A2058C et C2611T dans le gène de l'ARNr 23S de *C. trachomatis* (Misyurina *et al.*, 2004).

Comme mentionné précédemment, le mécanisme prépondérant de résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez *C. jejuni* repose aussi sur la présence de SNP (voir section 1.6.2.3). Grâce à notre banque de souches de *C. jejuni* pour lesquelles les phénotypes de résistance/sensibilité à ces antibiotiques sont connus (Levesque *et al.*, 2007), différentes approches moléculaires de détection de ces marqueurs de résistance ont été explorées. Il s'agit de la PCR TaqMan, du HRM et du TaqTm Probing.

### 2.2.1 Préparation des extraits d'ADN

Premièrement, 26 spécimens de *C. jejuni* résistants à l'érythromycine et 45 résistants à la ciprofloxacine, dont le phénotype de résistance a été établi préalablement par la méthode de la CMI, ont été sélectionnés. Suivant le protocole publié par le Dr Lévesque (Levesque *et al.*, 2011), les 71 spécimens ont été ensemencés sur des géloses sang et incubés 48h à une température de 42°C, sous une atmosphère de 5% d'oxygène. Pour chacune des géloses, des colonies ont été prélevées et mises en

suspension dans 500  $\mu\text{L}$  de saline afin d'obtenir une densité optique de 0,5 McFarland. Cette suspension a été centrifugée 10 min à 1200 RPM et le surnageant a été retiré. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 M a été ajouté au culot pour lyser les bactéries et libérer l'ADN. Après une incubation de 5 min la réaction a été neutralisée par l'ajout de 10  $\mu\text{L}$  de tampon TRIS 1 M pH 8,0 et le volume a été complété à 1 ml par l'ajout de 980  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Les extraits d'ADN ont ensuite été conservés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

### 2.2.2 Approche par PCR TaqMan

En s'inspirant des travaux du Dre Vacher (Vacher *et al.*, 2005) une méthode de PCR TaqMan pour détecter les SNP de résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine (A2075G et C256T) a d'abord été évaluée. Pour se faire, 15 différents couples d'amorces ciblant la mutation A2075G et deux couples ayant pour cible la mutation C256T ont été comparés. En plus, trois températures d'hybridation des amorces ont été comparées, soit  $55^{\circ}\text{C}$ ,  $58^{\circ}\text{C}$  et  $60^{\circ}\text{C}$ . Le design des différentes amorces a été effectué à l'aide du module OligoAnayzer (version 3.1) du logiciel en ligne IDT SciTools<sup>14</sup>.

Les réactions pour la détection du SNP A2075G ont été faites dans un volume de mélange réactionnel de 15  $\mu\text{l}$  contenant du 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche); 1  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ADN; 0,2  $\mu\text{M}$  des amorces (Cam23S1986F) et anti-sens (Cam23S2117R); 0,1  $\mu\text{M}$  de sonde (Camp23SWT-FAM); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Pour la détection du SNP C256T, les réactions finales ont été faites dans un volume de 15  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel contenant du 1X Roche LightCycler® 480 Probes Master; 1  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ADN; 0,2  $\mu\text{M}$  des amorces sens (CamGyr432F) et anti-sens (CamGyr664R); 0,1  $\mu\text{M}$  de sonde (CampGyrWT-FAM); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

---

<sup>14</sup> IDT SciTools<sup>®</sup> Web Tools (<http://www.idtdna.com/pages/scitools>)

Conditions PCR: 95°C [10:00 min]; 40 cycles (95°C [0:10 min], 60°C [0:30 min], 72°C [0:15 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>): 95°C [0:05 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 97°C à raison de 0,11°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.

### 2.2.3 Approche par analyse HRM

L'analyse par HRM des amplicons produit par PCR TaqMan a également été explorée. Les réactions ont été faites dans un volume final de 15 µl de mélange réactionnel contenant du 1X LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Kit (Roche); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 µl d'extrait d'ADN; 0,2 µM d'amorce sens (Cam23S1986F ou CamGyr432F); 0,2 µM d'amorces anti-sens (Cam23S2117R ou CamGyr664R); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Les réactions pour l'analyse par HRM avec sonde fluorescentes ont été faites dans un volume de 15 µl de mélange réactionnel contenant du 1X Roche LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Kit; 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 µl d'extrait d'ADN; 0,07 µM d'amorce sens (Cam23S1986F); 0,7 µM d'amorce anti-sens (Cam23S2117R); 0,7 µM de sonde non-fluorescente (Camp23ResITB); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [10:00 min]; 40 cycles (95°C [0:10 min], 60°C [0:30 min], 72°C [0:15 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (HRM): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 65°C à 97°C à raison de 0,02°C/sec avec 25 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler® 480 II real-time PCR system.

Les données de fluorescence de la courbe HRM ont été automatiquement normalisées et rapportées sur un graphique par le logiciel Roche LightCycler® 480 II Gene Scanning Software version 1.5.0.39.

### 2.2.4 Approche par TaqTm Probing

À partir des amorces et des sondes sélectionnées précédemment pour la PCR TaqMan, nous avons développé un protocole basé sur le TaqTm Probing.

Les réactions de détection du SNP A2075G ont été faites dans un volume de 15 µl de mélange réactionnel contenant du 1X Roche LightCycler® 480 Probes Master; 1 µl d'extrait d'ADN; 0,07 µM d'amorce sens (Cam23S1986F); 0,7 µM d'amorce anti-sens (Cam23S2117R); 0,1 µM de sonde (Camp23SWT-FAM); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Pour la détection du SNP C256T, les réactions ont été faites dans un volume de 15 µl de mélange réactionnel contenant du 1X Roche LightCycler® 480 Probes Master; 1 µl d'extrait d'ADN; 0,07 µM d'amorce sens (CamGyr432F); 0,7 µM d'amorce anti-sens (CamGyr664R); 0,1 µM de sonde (CampGyrWT-FAM), compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [10:00 min]; 40 cycles (95°C [0:10 min], 60°C [0:30 min], 72°C [0:15 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (Tm): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,02°C/sec avec 25 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.

Pour vérifier s'il est possible d'obtenir de meilleurs résultats en limitant le taux de dégradation des sondes, deux Taq polymérase dépourvues d'activité exonucléase, c.-à-d. une KlenTaq<sup>15</sup> maison (fabriquée par Mme Catherine Desrosiers, Coordonnatrice de laboratoire, Université de Sherbrooke) et la Vent<sub>R</sub><sup>®</sup>(exo-) DNA Polymerase<sup>16</sup> (10X ThermoPol Reaction Buffer, New England Biolab, Pickering, ON, Canada) ont été comparées, avec la Taq polymérase de Roche contenue dans le Roche LightCycler® 480 Probe Master Kit (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) et une Taq polymérase

<sup>15</sup> DNA Polymerase Technology. KlenTaq Products (<http://www.klentaq.com/products/klentaq>)

<sup>16</sup> New England Biolab. Vent<sub>R</sub><sup>®</sup>(exo-) DNA Polymerase (<https://www.neb.com/products/m0257-ventr-exo-dna-polymerase>)

standard maison (fabriquée par Mme Catherine Desrosiers, Coordonnatrice de laboratoire, Université de Sherbrooke). De plus, comme le TaqTm Probing dépend d'une asymétrie entre la concentration de l'amorce qui synthétise le brin complémentaire à la sonde et celle de l'amorce colinéaire à la sonde, 5 différents ratios de concentrations ont été évalués soit: 1:7 (0.1  $\mu\text{M}$  et 0.7  $\mu\text{M}$ ), 1:10 (0.07  $\mu\text{M}$  et 0.7  $\mu\text{M}$ ), 1:14 (0.05  $\mu\text{M}$  et 0.7  $\mu\text{M}$ ), 1:23 (0.03  $\mu\text{M}$  et 0.7  $\mu\text{M}$ ) et 1:70 (0.01  $\mu\text{M}$  et 0.7  $\mu\text{M}$ ).

#### 2.2.4.1 Protocole final

Finalement, les PCR ciblant les SNP A2075G et C256T ont été combinées en une seule réaction, ce qui a permis d'obtenir une méthode PCR multiplexe pouvant détecter simultanément la résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez *C. jejuni*.

Les réactions finales multiplexes ont été faites dans un volume de 15  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel contenant du 1X Roche LightCycler® 480 Probes Master; 1  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ADN; 0,07  $\mu\text{M}$  des amorces sens (Cam23S1986F et CamGyr432F); 0,7  $\mu\text{M}$  des amorces anti-sens (Cam23S2117R et CamGyr664R); 0,2  $\mu\text{M}$  de chacune des sondes (Camp23SWT-FAM, Camp23SMut-TEX615, CampGyrWT-HEX et CampGyrMut-TYE665).

Conditions PCR: 95°C [10:00 min]; 40 cycles (95°C [0:10 min], 60°C [0:30 min], 72°C [0:15 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (Tm): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,03°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler® 480 II real-time PCR system.



## **2.3 Devis de l'étude cas-témoins sur les échecs de traitement de la chlamydie génitale**

### **2.3.1 Échantillonnage**

#### **2.3.1.1 Prélèvements urogénitaux de patients**

Entre 2002 et 2012, les prélèvements urogénitaux de patients ayant eu deux épisodes ou plus de chlamydie génitale ont été conservés par le laboratoire de microbiologie clinique du CHUS. Il s'agit de prélèvements polymicrobiens placés dans un milieu de transport de lyse cellulaire, milieu à partir duquel est effectuée l'analyse diagnostique qui repose sur une amplification des acides nucléiques de *C. trachomatis* et sur leurs détections subséquentes par une réaction colorimétrique (AMPLICOR CT/NG Test, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada).

À partir de là, nous avons choisi de mener une étude rétrospective de type cas-témoins. Pour ce faire, les données contenues dans près de 800 fiches de résultat d'analyse associées aux prélèvements urogénitaux, ont d'abord été informatisées dans une base de données. De là, des numéros d'identification uniques ont été générés et attribués à chacun des prélèvements. Ceci permet d'amasser 506 prélèvements cliniques provenant de 204 patients.

#### **2.3.1.2 Souches de références**

Les souches de référence correspondant aux 15 géotypes de *C. trachomatis* ont été fournies par le Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ): **A**-G17/OT, **B**-TW-5/OT, **Ba**-LSPQ, **C**-TW-3/OT, **D**-UW-3/Cx, **E**-UW-5/Cx, **F**-UW-55 / Ur, **G**-UW-57/Ur, **H**-UW-4/Cx, **I**-UW-12/Ur, **J**-UW-36/Cx, **K**/ATCC-VR877, **L1**-LLCM440, **L2**-LLCM434 et **L3**-LLCM404.

### 2.3.2 Préparation des échantillons

Les prélèvements urogénitaux fournis par le laboratoire de microbiologie clinique du CHUS sont prêts à être utilisés et ne nécessitent aucun traitement supplémentaire.

Pour les souches de référence du LSPQ, l'ADN génomique a été extrait en mélangeant 10 µl de l'échantillon avec 90 µl de STM (AMPLICOR CT/NG Test). Après 10 min à température ambiante, 100 µl de solution CT/NG Specimen Diluant (AMPLICOR CT/NG Test) ont été ajoutés. Les extraits d'ADN ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

## 2.4 Mise au point de la méthode de détection de la résistance à l'azithromycine par PCR nichée en TaqTm Probing

### 2.4.1 Sélection des amorces

À l'aide du module ClustalW Multiple Alignment du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.5.3) il sera possible d'aligner la séquence du gène de l'ARNr 23S *C. trachomatis* avec celle de différentes bactéries commensales ou pathogènes retrouvées dans les sphères uro-génitale et ano-rectale, afin d'identifier des régions spécifiques de *C. trachomatis* aux bordures des SNP A2058C et C2611T (Misyurina *et al.*, 2004). À partir de là, en se servant du module OligoAnayzer (version 3.1) du logiciel en ligne IDT SciTools, il sera possible de faire le design d'amorces externes et d'amorces internes ciblant la mutation A2058C et la mutation C2611T. Pour s'assurer de la spécificité des différentes amorces, leurs séquences seront comparées à celles contenues dans la base de données du *U.S. National Center for Biotechnology Information*<sup>17</sup> à l'aide du programme de Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1990).

---

<sup>17</sup> NCBI Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

## 2.4.2 Extraction de l'ADN présent dans les selles

À partir d'une suspension microbienne provenant de selles, 100 µl de la suspension ont été transférés dans un tube de 1,5 ml et centrifugés à 10 000 RPM pour 5 min. Le surnageant a été retiré et 500 µl de solution d'extraction (3,5 ml d'éthanol 100%; 1 ml NaOH 0,5M) ont été ajoutés, puis le tout a été vortexé 5 sec. Le mélange est ensuite chauffé à 70°C durant 10 min et centrifugé à 10 000 RPM pour un autre 10 min. Finalement, le surnageant est retiré et 100 µl de solution Triton-Tween (489 ml d'eau stérile; 5 ml de Triton-X-100; 2,5 ml de Tween-20; 2,5 ml de Tris-HCL 2M pH8.0; 1 ml de EDTA-Na2 0,5M pH8.0) ont été ajoutés, puis vortexés 5 sec<sup>18</sup>.

## 2.4.3 Développement du système multiplexe par PCR nichée

### 2.4.3.1 PCR externe

Pour la PCR externe les résultats produits par les différentes combinaisons d'amorces, et ce, avec trois différentes polymérase: la Taq polymérase de Roche (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), la Taq polymérase de Qiagen (1X Qiagen® Multiplex PCR Plus Kit) et une Taq polymérase maison (fabriqué par Mme Catherine Desrosiers, Coordinatrice de laboratoire) ont été comparés.

Les réactions ont été faites dans un volume de mélange réactionnel de 15 µl contenant du tampon PCR maison 1X supplémenté de Taq polymérase maison; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP; SYBR Green 1X; 1 µl d'extrait d'ADN; 0,2 µM d'amorces sens et anti-sens; compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [05:00 min]; 40 cycles (95°C [0:10 min], 57°C [0:30 min], 72°C [1:00 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (T <sub>m</sub> ): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,11°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.
--

---

<sup>18</sup> CHUS Manuel de procédures des laboratoires. PRM-8200-SARM-01A. Section 6.8.2. p. 10 à 11

Les produits de la PCR externe ont ensuite été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (Promega) à côté d'un marqueur de poids moléculaire (1kb DNA Ladder, Invitrogen). Après une migration d'une heure à 50 mA, les gels ont été colorés pendant 10 minutes par trempage dans une solution de 1 µg/ml de bromure d'éthidium (Sigma). Les gels ont été photographiés sous une exposition aux rayons UV à l'aide du logiciel Alphascreen 1220 (version 5.5) de l'appareil ChemiImager Ready. Les photos prises ont quant à elles été retouchées avec le logiciel Adobe Photodeluxe (version 2.0).

#### 2.4.3.2 PCR interne

Pour les deux PCR internes, les différentes combinaisons d'amorces ont été comparées afin de trouver celles qui offraient les meilleurs rendements, autant au niveau des courbes de Cp que de Tm.

Les réactions ont été faites dans un volume de mélange réactionnel de 15 µl contenant du 1X Roche LightCycler® 480 SYBR Green I Master; 1 µl de produit de la PCR externe; 0,2 µM d'amorces sens et anti-sens; compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [00:20 min]; 40 cycles (95°C [0:20 min], 57°C [1:00 min], 72°C [2:00 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (Tm): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,11°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.

Par la suite, des sondes de détection ciblant le SNP A2058C et le SNP C2611T ont été sélectionnées et combinées dans chacune des deux PCR internes.

#### 2.4.4 Protocole final

Tout comme pour la détection simultanée de la résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez *C. jejuni*, nous avons combiné ensemble les deux PCR internes en une seule réaction. Ceci a permis d'obtenir une méthode de PCR multiplexe pouvant

détecter simultanément les deux mutations potentielles de résistance à l'azithromycine chez *C. trachomatis*.

#### 2.4.4.1 PCR externe

Les réactions ont été faites dans un volume de mélange réactionnel de 50 µl contenant du 1X Qiagen® Multiplex PCR Plus Kit; 20 µl d'échantillon; 0,25 µM des amorces sens (Ct23s1985A.F) et anti-sens (Ct23s2823.R); 0,2 mM de dNTP; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [1:30 min]; 35 cycles (95°C [0:30 min], 57°C [1:00 min], 72°C [2:00 min]) et 72°C [5:00 min]; effectuée avec un Perkin Elmer Thermocycleur GeneAmp 9600.

#### 2.4.4.2 PCR interne

Un volume de 1 µl de produit de la PCR externe est ensuite amplifié dans un volume total de réaction de 15 µl contenant du 1X Roche LightCycler® 480 Probes Master; 0,70 µM des amorces sens (Ct23s2001B.F) et anti-sens (Ct23s2683.R); 0,07 µM des amorces sens (Ct23s2528.F) et anti-sens (Ct23s2105.R); 0,2 µM des sondes nucléotidiques (Ct23R2076HEX et Ct23R2632RFAM); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [5:00 min]; 40 cycles (95°C [0:20 min], 57°C [1:00 min], 72°C [0:10 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,02°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.

## 2.5 Combinaison des méthodes de génotypage et de détection de la résistance à l'azithromycine

Le génotypage des spécimens de *C. trachomatis* présents dans les prélèvements uro-génitaux a été effectué à l'aide d'une méthode de typage moléculaire basé sur

l'analyse polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) du gène *ompA* (Frost *et al.*, 1993). Une méthode de référence qui a été développée dans notre laboratoire par le Dr Frost et permet d'obtenir le même résultat que si le typage avait été effectué par une épreuve sérologique.

Considérant que le protocole de génotypage par RFLP est basé sur la PCR nichée tout comme notre analyse de détection de résistance, et surtout afin de conserver les spécimens cliniques que nous avons en quantité limitée, nous avons décidé de réaliser les deux PCR externes en multiplexe. En résumé, une première PCR a été effectuée en combinant les amorces externes pour le gène *ompA* et le gène qui code pour ARNr 23S. Ensuite, le produit de cette PCR a servi de cible commune à deux PCR internes indépendantes. La première étant composée du couple d'amorces internes ciblant le gène *ompA* et la deuxième des deux couples d'amorces internes ciblant spécifiquement le SNP A2028C et le SNP C2611T du gène de l'ARNr 23S. Cette façon de faire permet de réduire cinq PCR à seulement trois.

Pour ce qui est des patrons de restriction RFLP produits par la digestion des produits de la PCR interne, ces derniers ont été envoyés à Mathieu Durand de la plateforme d'analyse du Centre de Rnomique de l'Université de Sherbrooke, pour être visualisés par un système électrophorèse capillaire.

### **2.5.1 PCR externe en multiplexe (*ompA* et 23S)**

Les réactions ont été faites dans un volume de mélange réactionnel de 50 µl contenant du 1X Qiagen® Multiplex PCR Plus Kit; du 1X Qiagen® Q-Solution; 14 µl prélèvements urogénitaux; 0,25 µM des amorces sens (Ct23s1985A.F et EF93\_ompA-1) et anti-sens (Ct23s2823.R et EF93\_ompA-2); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [1:30 min]; 35 cycles (95°C [0:30 min], 55°C [1:00 min], 72°C [2:00 min]) et 72°C [5:00 min]; effectuée avec un Perkin Elmer Thermocycleur GeneAmp 9600.
---

### 2.5.2 PCR interne (ompA)

Un volume de 1 µl de produit de la PCR externe est ensuite amplifié dans un volume total de réaction de 50 µl contenant 1X Qiagen® Multiplex PCR Plus Kit; du 1X Qiagen® Q-Solution; 0,25 µM d'amorces sens (EF93\_ompA-3) et anti-sens (EF93\_ompA-4); compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 94°C [1:30 min]; 39 cycles (55°C [5:00 min], 72°C [3:00 min], 94°C [1:00 min]); 55°C [5:00 min] et 72°C [10:00 min]; effectuée avec un Perkin Elmer Thermocycleur GeneAmp 9600.

Par la suite un volume de 1 µl d'ADN amplifié a été digéré à 37°C durant 60 min dans un volume total de réaction de 10 µl. Le mélange réactionnel contient 0,5 U/µl des enzymes de restriction AluI et MspI (New England BIOLAB: R0137S et R0106T respectivement, Pickering ON) et du tampon de digestion 1X (New England BIOLAB 10X NEBuffer 4, Pickering ON); compléter avec de l'eau. La digestion a été effectuée dans un Perkin Elmer Thermocycleur GeneAmp 9600.

Une fois la digestion terminée, un volume de 10 µl d'EDTA à 10 mM a été ajouté à la réaction pour inactiver les enzymes de restriction. Les 20 µl finaux ont été envoyés au Centre de Rnominique de l'Université de Sherbrooke, pour une analyse par électrophorèse capillaire des fragments RFLP (LabChip 90 de Caliper Lifescience). Les profils de migration ont ensuite été comparés aux profils des 15 génotypes de références.

### 2.5.3 PCR interne (23S)

Un volume de 1 µl de produit de la PCR externe est ensuite amplifié dans un volume total de réaction de 15 µl contenant du 1X Roche LightCycler® 480 Probes Master; 0,70 µM des amorces Ct23s2001B.F et Ct23s2683.R; 0,07 µM des amorces Ct23s2528.F et Ct23s2105.R; 0,2 µM des sondes nucléotidiques (Ct23R2076HEX et Ct23R2632RFAM); 2,5 ng/ml de BSA; compléter avec de l'eau PCR-Grade

Conditions PCR: 95°C [5:00 min]; 35 cycles (95°C [0:20 min], 55°C [1:00 min], 72°C [0:10 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,02°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.

## 2.6 Évaluation semi-quantitative de la charge bactérienne dans les spécimens cliniques

Comme mentionné précédemment, il a été décidé d'évaluer la quantité de chlamydiae dans les prélèvements urogénitaux de façon semi-quantitative. Pour ce faire, nous avons développé une PCR TaqMan ayant pour cible une séquence du plasmide cryptique présent chez *C. trachomatis*. En fait, cette réaction emploie les mêmes amorces que celles du test diagnostique AMPLICOR CT/NG Test, puisque leur grande spécificité et sensibilité ont été attestées. Ce test peut être plus sensible que la détection du gène qui code pour l'ARNr 23S, car ce dernier est présent en deux copies dans le génome (Misyurina *et al.*, 2004), tandis qu'il y a en moyenne 4 copies du plasmide cryptique (Pickett *et al.*, 2005) dans la bactérie. Le design des sondes sera fait à l'aide du module OligoAnayzer (version 3.1) du logiciel en ligne IDT SciTools. Pour ce qui est des PCR, elles ont été faites dans un volume de mélange réactionnel de 15 µl contenant du 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche); 1 µl d'extrait d'ADN; 0,7 µM des amorces CP 24 et CP27; 0,2 µM de sonde (CP IDT-A FAM); 2,5 ng/ml de BSA; compléter avec de l'eau PCR-Grade.

Conditions PCR: 95°C [5:00 min]; 45 cycles (95°C [0:15 min], 55°C [0:30 min], 72°C [0:15 min]); suivie d'une courbe de dénaturation (T<sub>m</sub>): 95°C [1:00 min]; 40°C [1:00 min], 45°C à 95°C à raison de 0,02°C/sec avec 5 acquisitions/°C); effectuée avec un Roche LightCycler 480 II real-time PCR system.



## RÉSULTATS

### 3.1 Développement et mise au point de méthodes moléculaires

#### 3.1.1 Détection de résistances aux antibiotiques chez *C. jejuni*

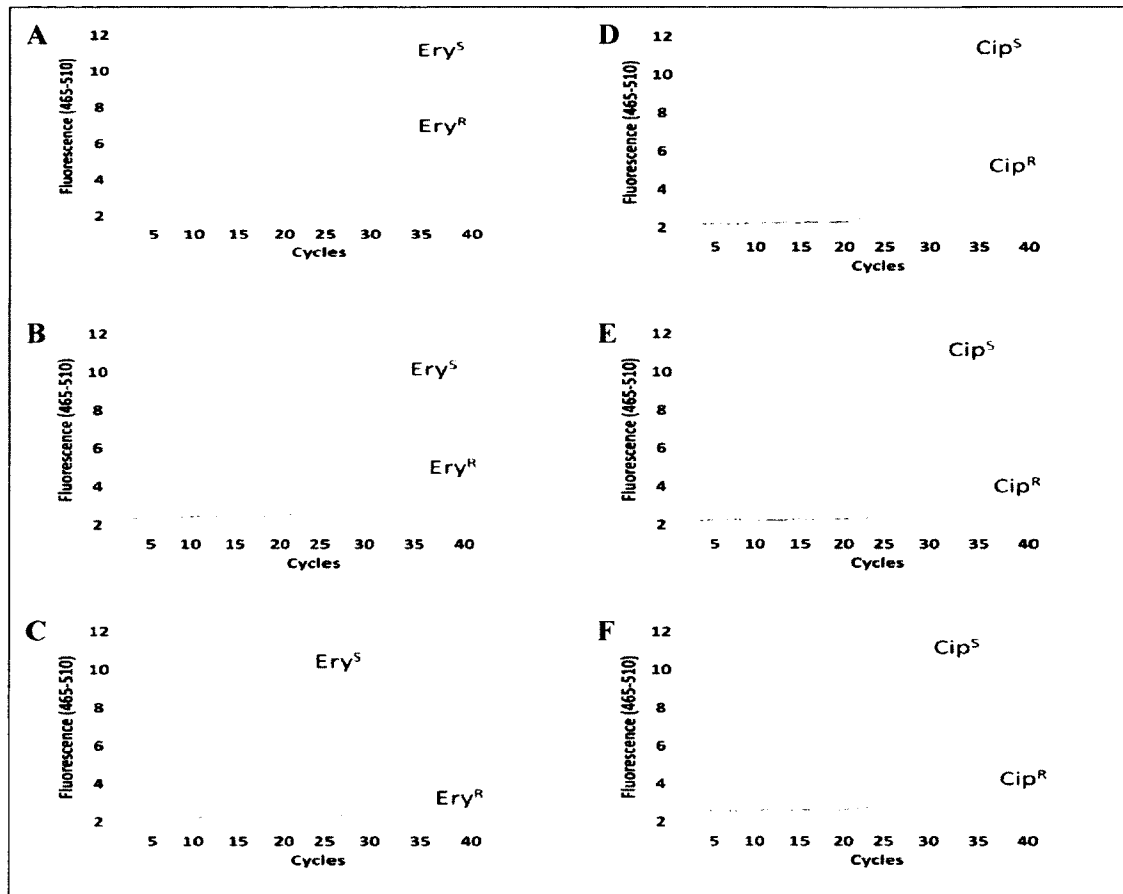
Le séquençage du gène de l'ARNr 23S des spécimens cliniques résistants à l'azithromycine de *C. trachomatis* a permis d'identifier des mutations ponctuelles (Misyurina *et al.*, 2004). Or, comme mentionné dans l'introduction, il s'agit du même mécanisme qui est employé par *C. jejuni* pour résister aux macrolides (Iovine, 2013). Considérant que nous disposons d'une importante collection de spécimens de *C. jejuni* résistants (Levesque *et al.*, 2008) nous avons d'abord choisi de mettre au point une méthode moléculaire de détection des SNP de résistance chez cette bactérie, où nous pourrions nous servir de souches dont les profils de sensibilité sont connus, pour ensuite l'appliquer à notre projet sur *C. trachomatis*.

##### 3.1.1.1 Approche par PCR TaqMan

L'approche basée sur la PCR TaqMan a d'abord été explorée afin de faire une détection moléculaire de résistance aux antibiotiques chez *C. jejuni*. Pour ce faire, les amorces spécifiques à la région où se trouve la mutation dans le gène de l'ARNr 23S fournies par Vacher *et al.* (2005) (CampS-F et de CampA-R) ont été utilisées. La température d'hybridation de 55°C suggérée dans l'article est trop permissive, car en plus de l'hybridation des amorces, la détection de l'hybridation de la sonde se fait aussi à cette température (Figure 2 A). De plus, bien qu'il y ait eu une bonne amplification à cette température, il y a des appariements non-spécifiques des sondes. En augmentant la température d'hybridation à 58°C (Figure 2 B), puis à 60°C (Figure 2 C), il devient possible de conserver une bonne amplification et d'éliminer complètement les appariements non-spécifiques. Par contre, s'il y a une souche qui a une mutation dans la séquence d'hybridation des amorces il est possible qu'il n'y ait pas d'amplification.

Pour l'amplification du gène *gyrA*, dont une mutation dans la région QRDR provoque une résistance à la ciprofloxacine chez *C. jejuni*, ce sont également les

amorces fournies par Vacher *et al* (2005) qui ont été employées (CamGyr432F et CamGyr664R). Ici aussi, le même problème d'appariement non spécifique a été observé à 55°C (Figure 2 D) et à 58°C (Figure 2 E), et c'est la température de 60°C qui s'est révélée la plus adéquate (Figure 2 F).



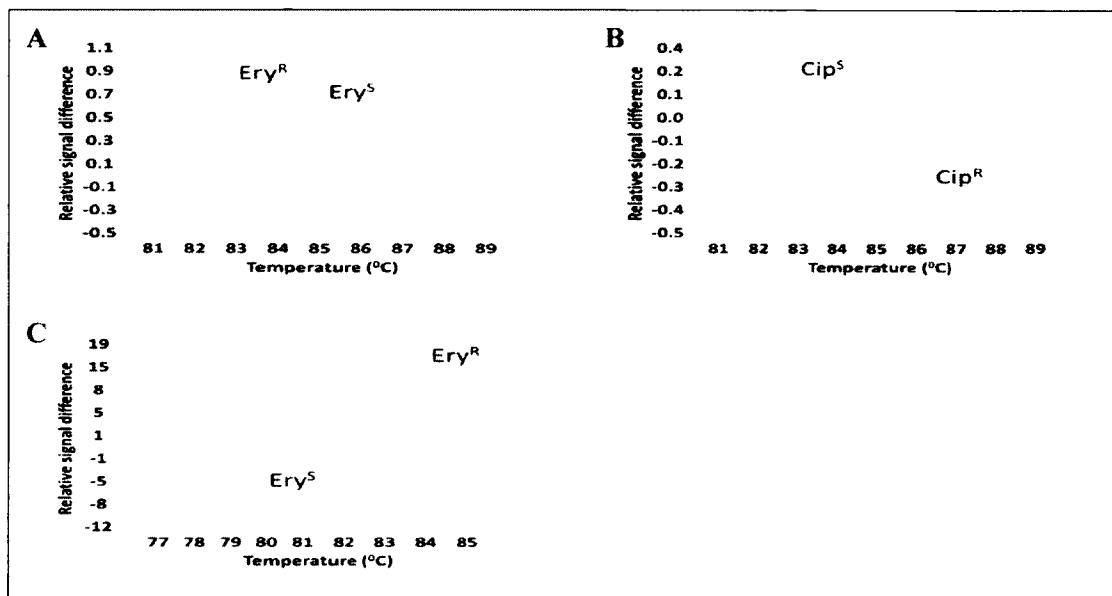
**Figure 2: Courbe d'amplification (Cp) selon différentes températures d'hybridation des amorces.** Courbe d'amplification (Cp) selon différentes températures d'hybridation des amorces. Des PCR ayant pour cible le gène de l'ARNr 23S ont été effectuées à partir d'extrait d'ADN de spécimens de *C. jejuni* sensibles (Ery<sup>S</sup>) ou résistants (Ery<sup>R</sup>) à l'érythromycine. Les réactions ont été faites à avec une température d'hybridation des amorces de 55°C (A), 58°C (B) et de 60°C (C). Les mêmes PCR ont été reproduites à partir d'extrait d'ADN de spécimens sensibles (Cip<sup>S</sup>) ou résistants (Cip<sup>R</sup>) à la ciprofloxacine et ayant pour cible gène *gyrA*. Les réactions ont été faites a avec une température d'hybridation des amorces de 55°C (D), 58°C (E) et de 60°C (F).

Une fois que les conditions de base de la PCR établies, il a été possible d'optimiser le choix des amorces employées pour la réaction. En tout, 5 amorces sens et 3 amorces anti-sens (comprenant entre autres CampS-F et CampA-R) ont été combinées pour former 15 différents couples. Les résultats montrent que les meilleures

courbes d'amplification et d'intensités de fluorescence ont été obtenues avec les amorces Cam23S1986F et Cam23S2117R. Deux couples d'amorces ont été comparés pour la réaction ciblant le gène *gyrA*. Le couple composé des CamGyr432F et CamGyr664R a produit d'excellents résultats dès le départ, il n'a donc pas été utile d'en essayer d'autre. L'amplicon produit par la PCR ciblant le gène de l'ARNr 23S a une taille de 131 pb, alors que celui produit par la PCR ciblant le gène *gyrA* fait 232 pb. Toutefois, d'autres mutations dans le gène de l'ARNr 23S peuvent se trouver dans la zone d'hybridation de la sonde. La détection de résistance deviendrait alors plus difficile, car le mésappariement nucléotidique au niveau de la mutation pourrait interférer avec l'hybridation de la sonde. Ceci limite donc l'emploi de la PCR TaqMan pour la détection de SNP.

#### 3.1.1.2 Approche par analyse HRM

Pour la détection de résistance à l'érythromycine, l'analyse par HRM du patron de dénaturation des amplicons (Figure 3 A) n'a pas montré de différence significative entre les spécimens sensibles et résistants, contrairement à ce qui était attendu. Par contre, pour ce qui est de la détection de résistance à la ciprofloxacine, il est possible de faire une nette distinction (Figure 3 B).



**Figure 3: Courbes de dénaturation haute résolution des amplicons spécifiques à une région de gène de l'ARNr 23S et du gène *gyrA* de *C. jejuni*.**

Des spécimens sensibles (Ery<sup>S</sup>) et résistants (Ery<sup>R</sup>) à l'érythromycine ont été analysés en (A), alors que des spécimens sensibles (Cip<sup>S</sup>) ou résistants (Cip<sup>R</sup>) à la ciprofloxacine ont été analysés en (B). Afin d'améliorer la discrimination entre les spécimens sensibles (Ery<sup>S</sup>) et résistants (Ery<sup>R</sup>) à l'érythromycine (C), une sonde non-fluorescente ciblant le gène de l'ARNr 23S a été ajoutée à une PCR asymétrique.

Pour améliorer la détection de résistance à l'érythromycine nous avons fait une PCR asymétrique et avons ajouté une sonde non-fluorescente ayant pour cible le SNP A2075G (Figure 3 C).

Bien que profitable dans un laboratoire de recherche, les variations possibles dans les profils HRM pour un même gène, doublé de la complexité des analyses, présentent des difficultés importantes pour l'implantation dans un laboratoire clinique. Or, c'est justement dans une telle optique que sont orientés les travaux de recherche présentés dans ce mémoire, ce qui disqualifie l'analyse par HRM. De plus, il n'est pas possible de mettre au point un système multiplexe détectant simultanément les SNP de résistances à l'érythromycine et à la ciprofloxacine. Pour surmonter ces problèmes, nous avons mis au point une nouvelle méthode de PCR en temps réel que nous avons nommée le TaqTm Probing.

### 3.1.1.3 Approche par TaqTm Probing

Le TaqTm Probing est une nouvelle méthode PCR qui a été développée dans mon projet de maîtrise, à la suite des travaux débutés durant un stage antérieur. Basé sur la PCR TaqMan, le TaqTm Probing emploie simultanément deux sondes d'hydrolyse couplées à des fluorophores différents. Les deux sondes ciblent la même région d'ADN où se trouve le SNP de résistance. Par contre, l'une des sondes est complémentaire à la séquence de type sauvage, alors que l'autre est complémentaire à la séquence mutante. L'innovation avec le TaqTm Probing c'est que la PCR se fait avec un couple d'amorces dont les concentrations sont asymétriques. Ceci veut dire que la concentration de l'amorce qui synthétise le brin complémentaire aux sondes est plus élevée que la concentration de l'amorce colinéaire, c.-à-d. l'amorce à partir de laquelle l'élongation dégradera les sondes hybridées. L'asymétrie des concentrations d'amorces permet donc la synthèse en excès du brin de séquence complémentaire aux sondes par rapport à l'autre. Du même coup, comme il y a moins de synthèse du brin colinéaire aux sondes, une certaine quantité de sondes ne sera pas dégradée et sera encore intacte à la fin de la réaction. Ce phénomène est d'autant plus accentué si le ratio d'asymétrie entre les concentrations d'amorces est élevé et si la concentration initiale de sonde l'est également. Au niveau de la PCR, si le spécimen bactérien analysé est porteur d'un gène de sensibilité, la compétition avec la sonde de type sauvage lors de la PCR empêchera la sonde mutante de s'hybrider avec la cible. Le phénomène inverse se produit si le spécimen bactérien est porteur d'un gène de résistance. Ceci assure une détection sélective, mais le TaqTm Probing ne s'arrête pas là!

À l'étape de la courbe de dénaturation, les brins sens et anti-sens des amplicons se lieront entre eux comme cela est attendu. Cependant, dû au ratio d'asymétrie, il restera des brins en excès complémentaires à la sonde. Cela permettra aux sondes qui n'ont pas été dégradées durant la PCR de s'hybrider avec ces brins, pour former des complexes «sonde-amplicon». Dans le cas, par exemple, de l'analyse d'un spécimen bactérien résistant, la présence du SNP va créer un mésappariement nucléotidique lors de l'hybridation avec les sondes de type sauvage. Les complexes « sonde-amplicon » ainsi formés seront donc moins stables que ceux issus de l'hybridation avec les sondes mutantes. De ce fait, les complexes «sonde-amplicon» moins stables auront une

température de dénaturation ( $T_m$ ) plus basse que les autres. La différence entre le  $T_m$  obtenu avec la sonde de type sauvage versus celui obtenu avec la sonde mutante permet de détecter facilement la présence (ou l'absence) de SNP de résistance.

De plus, chez un spécimen bactérien sensible cette fois-ci, la présence d'une mutation silencieuse dans la zone d'hybridation des sondes causera un mésappariement nucléotidique avec la sonde de type sauvage. Conséquemment, la valeur du pic de  $T_m$  avec cette sonde indiquera une bactérie faussement résistante. Cependant, grâce à la deuxième sonde, le double mésappariement qu'une mutation silencieuse produira avec la sonde mutante décalera à son tour le pic de  $T_m$  de résistance vers une température inférieure. Résultat, nos deux pics indiqueront des valeurs de  $T_m$  plus basses qu'attendu et nous saurons que la bactérie est porteuse d'une mutation silencieuse, mais pas d'une mutation de résistance.

Nous avons obtenu en 2010 un brevet provisoire d'un an sur le Taq $T_m$  Probing de la part du *United States Patent and Trademark Office*. Malheureusement, au bout de cette période il n'a pas été possible d'aller plus loin dans nos démarches et nous avons dû abandonner le projet de brevet.

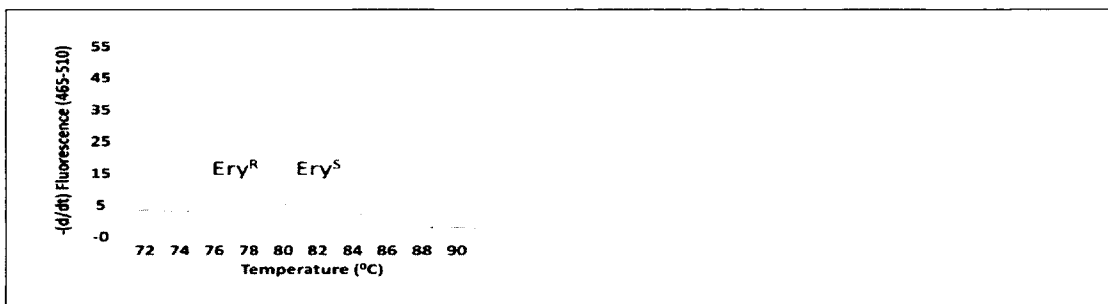
Voici maintenant les résultats des expériences qui nous ont permis de développer et de mettre au point les analyses employant le Taq $T_m$  Probing.

#### 3.1.1.3.1 Développement du Taq $T_m$ Probing

Durant les différents essais employant une PCR TaqMan, il est arrivé à quelques reprises d'observer de petits pics de  $T_m$  lors de courbes de dénaturation. Or, une courbe de dénaturation ne peut théoriquement pas être obtenue en utilisant une sonde TaqMan. Selon le principe TaqMan la sonde est dégradée lors de la réaction d'amplification afin de générer de la fluorescence. Il n'est alors pas possible d'enregistrer de la fluorescence post-PCR selon le principe Molecular Beacon.

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la sonde qui est normalement dégradée par l'élongation du brin colinéaire voit son taux de dégradation diminuer lorsque les

amorces sont dans des concentrations asymétriques (voir section 3.1.1.3), nous avons mis au point une PCR asymétrique avec un agent intercalant, en plus d'y ajouter une sonde non-fluorescente (Figure 4). Cette expérience a été faite avec une sonde complémentaire à la séquence de type sauvage du gène de l'ARNr 23S. Des spécimens de *C. jejuni* sensibles et résistants à l'érythromycine ont été soumis à cette méthode PCR.



**Figure 4: Courbes de dénaturation ( $T_m$ ) des amplicons spécifiques à une région du gène de l'ARNr 23S et du gène *gyrA* de *C. jejuni*.**

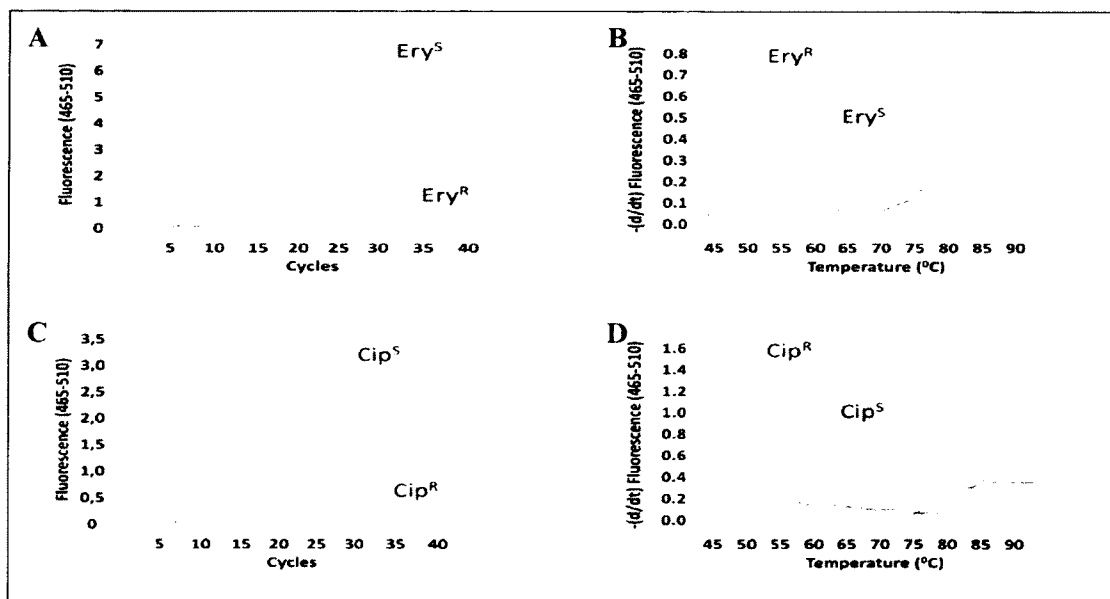
La courbe est basée sur une PCR asymétrique auquel a été ajoutée une sonde de séquence de type sauvage non-fluorescente. Le premier pic correspond à la dénaturation de la sonde et de l'amplicon de séquence résistante ( $Ery^R$ ), le deuxième correspond à la dénaturation de la sonde de l'amplicon de séquence sauvage ( $Ery^S$ ) et finalement, le troisième pic représente la dénaturation entre les amplicons complémentaires.

À l'étape de la courbe de dénaturation, trois pics de  $T_m$  à différentes températures ont été rapportés grâce à la fluorescence de l'agent intercalant. Tout d'abord, le mésappariement nucléotidique au niveau du SNP de résistance entre la sonde de type sauvage et le gène de résistance a créé des complexes « sonde-amplicon » moins stables (qui dénature à une température plus basse) que les complexes « sonde-amplicon » issus de l'hybridation entre cette même sonde et le gène sensible. Graphiquement, cela s'est traduit par un pic de  $T_m$  à une température inférieure pour les premiers complexes par rapport aux seconds. Finalement, un 3e pic d'amplitude beaucoup plus importante a été observé et correspondait au  $T_m$  des amplicons doubles brins, plus longs et donc à température de dénaturation plus élevée.

La différence entre le  $T_m$  obtenu avec la sonde de type sauvage pour les bactéries sensibles versus celui obtenu pour les bactéries résistantes, permet de les distinguer facilement et de détecter la présence (ou l'absence) de SNP de résistance. Cependant, ce système est limité, car s'il y a une mutation silencieuse dans la zone d'hybridation de la

sonde, la courbe de dénaturation indiquera faussement qu'il y a résistance alors que ce n'est pas le cas. De plus, la taille importante de pic de dénaturation de l'amplicon due à sa grande taille, tend à masquer les pics des complexes « sonde-amplicon » de séquence double brin beaucoup plus courte. Aussi, comme dans le cas de l'analyse par HRM, l'utilisation d'agent intercalant limite le nombre de cibles pouvant être analysées en même temps.

En choisissant de garder le principe d'asymétrie dans la concentration des amorces, mais en y ajoutant les sondes TaqMan fluorescentes, cela modifie l'apparence graphique des résultats puisque seulement les pics correspondant à la dénaturation des complexes sondes-amplicons sont visibles (Figure 5). Il n'y a plus de pic pour la dénaturation de l'amplicon, car en l'absence d'agent intercalant dans la réaction aucune fluorescence n'y est associée. La sonde spécifique à la séquence de type sauvage du gène de l'ARNr 23S a permis une excellente distinction entre les bactéries sensibles et résistantes autant pour l'érythromycine que pour la ciprofloxacine. Dans chaque cas, seulement une des deux sondes a donné un résultat positif.



**Figure 5: Courbes d'amplification (Cp) et de dénaturation (Tm) des amplicons spécifiques à une région du gène de l'ARNr 23S et du gène *gyrA* de *C. jejuni*.**

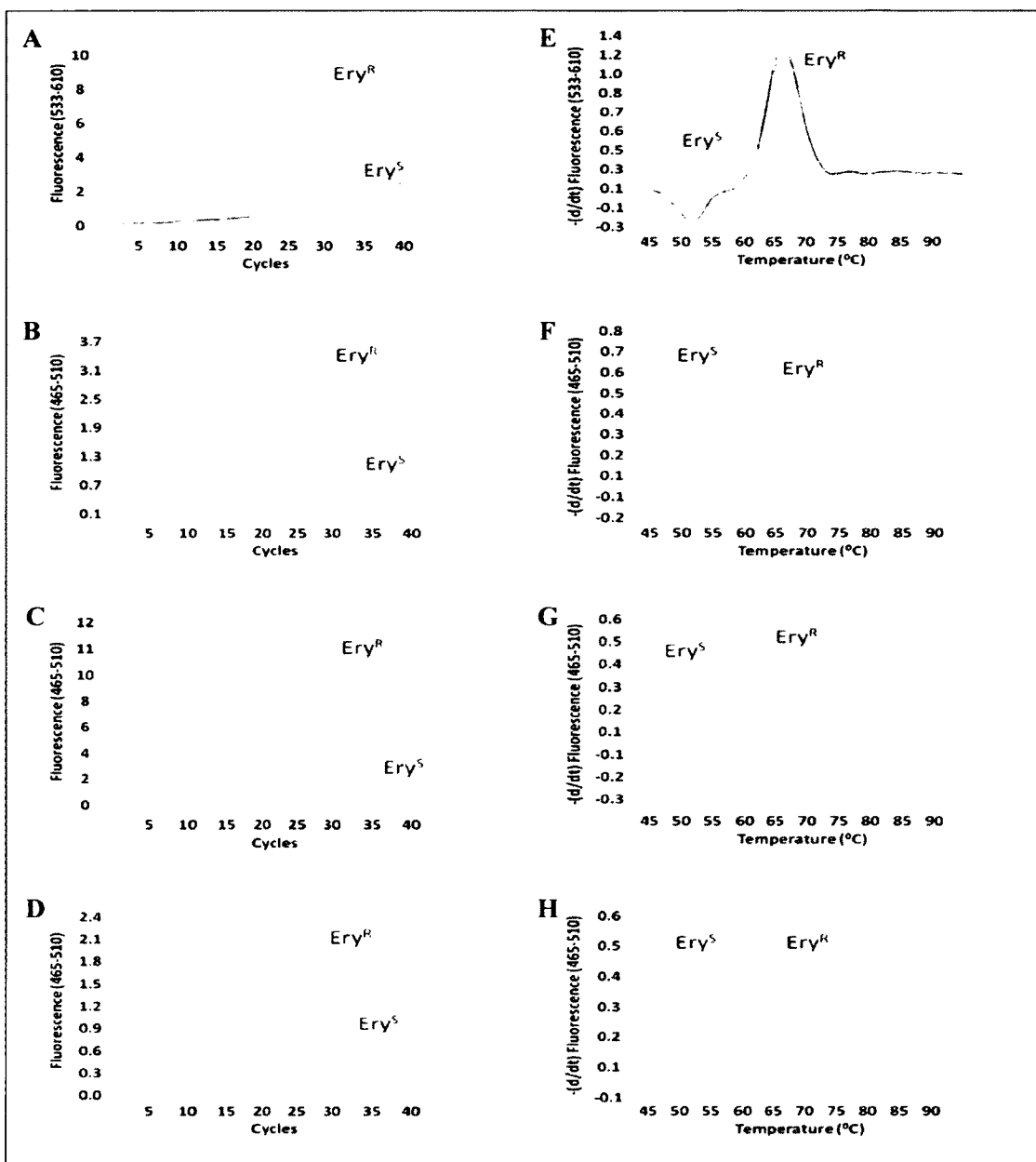
Basée sur une PCR asymétrique avec sonde fluorescente en (A) et (B) des courbes de Cp et de Tm obtenues à partir de spécimens sensibles (Ery<sup>S</sup>) et résistants (Ery<sup>R</sup>) à l'érythromycine. En (C) et (D) des courbes de Cp et de Tm obtenues à partir de spécimens sensibles (Cip<sup>S</sup>) ou résistants (Cip<sup>R</sup>) à la ciprofloxacine.



### 3.1.1.3.2 Optimisation du TaqTm Probing

Parallèlement aux observations faites sur les analyses TaqMan chez *C. jejuni*, mon directeur de recherche a remarqué en faisant des analyses de virus respiratoires multiplexes en employant une sonde TaqMan pour le virus respiratoire syncytial (VRS) et des sondes FRET pour influenza A et B, qu'il observait des courbes de cinétique d'amplification pour les 3 sondes et des courbes de dénaturation pour les sondes FRET. Par contre, parfois des courbes de dénaturation étaient observées même pour les sondes TaqMan, malgré le fait que les sondes auraient dû être hydrolysées. Nous avons pensé que lorsque les sondes TaqMan s'hybrident au brin complémentaire, les extrémités de la sonde qui portent le fluorophore et le *quencher* s'éloignent l'un de l'autre, empêchant ainsi le *quencher* de capter la lumière émise par le fluorophore. Cela laisse alors paraître le signal comme c'est le cas avec les sondes Molecular Beacon. Pour améliorer ce phénomène, différentes stratégies pour limiter la dégradation des sondes ont été évaluées, en s'assurant toutefois de ne pas nuire à la PCR.

La dégradation des sondes TaqMan a lieu lors de l'élongation du brin colinéaire à la sonde, via l'activité exonucléase de la polymérase. Deux différentes Taq polymérase dépourvues de cette activité, la KlenTaq et la Vent, ont donc été choisies et comparées avec la Taq polymérase de Roche contenue dans le Roche LightCycler® 480 Probe Master Kit et une Taq polymérase standard (Figure 6)



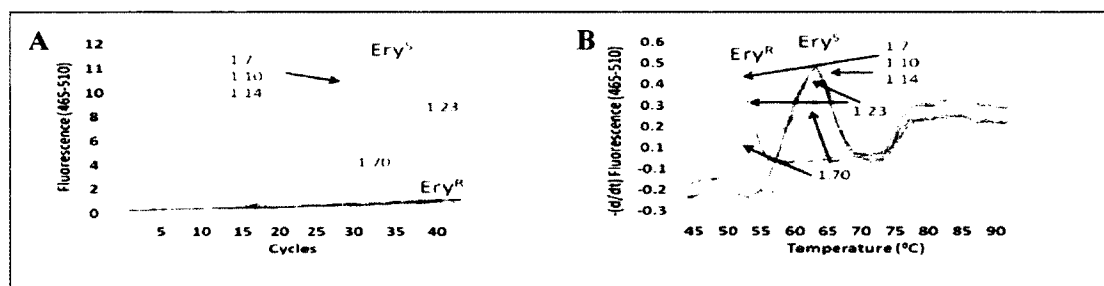
**Figure 6: Comparaison de différentes Taq polymérase pour la détection par TaqTm Probing de SNP de résistance dans le gène de l'ARNr 23S de *C. jejuni*.**

À partir de spécimens sensibles ( $Ery^S$ ) et résistants ( $Ery^R$ ) à l'érythromycine des PCR ont été faites avec la Taq polymérase de Roche contenue dans le Roche LightCycler® 480 Probe Master Kit (A, E), la KlenTaq maison (B, F), la Taq polymérase standard maison (C, G) et la Vent<sub>r</sub>® (exo-) DNA Polymerase (D, H).

La Taq polymérase de Roche et la Taq polymérase standard faite maison sont les deux polymérases qui ont présenté les meilleures courbes de cinétique d'amplification avec les meilleures intensités de fluorescence, et ce, autant au niveau des courbes

d'amplification (Cp) que de dénaturation (Tm). Même après différents essais, il n'a pas été possible d'obtenir de meilleurs résultats en utilisant la KlenTaq ou la Vent. Au final, nous avons choisi d'utiliser la Taq polymérase de Roche, puisqu'elle provient d'un kit commercial dont la robustesse a été éprouvée.

Au niveau des ratios de concentration d'amorces (Figure 7), parmi les 5 ratios d'amorces qui ont été comparés ce sont les ratios 1:7 (0.1  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M), 1:10 (0.07  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M) et 1:14 (0.05  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M) qui ont donné les meilleurs résultats. C'est le ratio 1:10 qui a été choisi puisqu'il est intermédiaire entre les deux autres bonnes conditions, mais aussi parce qu'il s'agit de notre condition de départ.



**Figure 7: Comparaison de différents ratios d'asymétrie dans la concentration des amorces pour la détection par TaqTm Probing de SNP de résistance dans le gène de l'ARNr 23S de *C. jejuni*.**

Comparaison de différents ratios d'asymétrie dans la concentration des amorces pour la détection par TaqTm Probing de SNP de résistance dans le gène de l'ARNr 23S de *C. jejuni*. À partir de spécimens sensibles (Ery<sup>S</sup>) et résistants (Ery<sup>R</sup>) à l'érythromycine des PCR ont été faites avec un ratio d'amorce sens/anti-sens de: 1:7 (0.1  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M), 1:10 (0.07  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M), 1:14 (0.05  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M), 1:23 (0.03  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M) et 1:70 (0.01  $\mu$ M et 0.7  $\mu$ M). En (A) les courbes de Cp et en (B) les courbes de Tm.

### 3.1.1.3.3 Combinaison des deux PCR dans un système multiplexe

Maintenant qu'il est possible de détecter individuellement la résistance à l'érythromycine et celle à la ciprofloxacine, les deux méthodes ont été combinées ensemble afin de former un système de détection multiplexe. À ce système comportant déjà des sondes complémentaires aux séquences de type sauvage de chacun des deux gènes, ont été ajoutées des sondes complémentaires aux séquences mutantes. Au final, le système multiplexe se compose de 2 couples d'amorces (Cam23S1986F/Cam23S2117R et CamGyr432F/CamGyr664R) et de 4 sondes ayant chacune un fluorophore différent (Camp23SWT-FAM/Camp23SMut-TEX615 et CampGyrWT-HEX/ CampGyrMut-TYE665)

### 3.1.1.4 Évaluation de l'analyse diagnostique

Cette PCR multiplexe basé sur le TaqTm Probing peut détecter simultanément la résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez *C. jejuni*. Pour évaluer la validité d'une nouvelle analyse diagnostique, il faut comparer les résultats obtenus avec ceux d'une analyse de référence appelée « Étalon d'or ». Ici, l'analyse de référence sera l'évaluation par la méthode de la CMI du profil de résistance pour chacun des deux antibiotiques.

Cette comparaison des résultats obtenus par le TaqTm Probing et par la CMI permet d'établir un tableau de contingence (Tableau 2) constitué de quatre valeurs : les vrais positifs (résistance détectée par le TaqTm Probing et par la CMI), les vrais négatifs (aucune résistance détectée par le TaqTm Probing ni par la CMI), les faux positifs (résistance détectée par le TaqTm Probing, mais pas par la CMI) et finalement les faux négatifs (résistance non détectée par le TaqTm Probing, mais détectée par la CMI).

**Tableau 2: Tableau de contingence pour l'évaluation d'un test diagnostique.**

	CMI+	CMI-	Total
TaqTm Probing+	VP	FP	VP + FP
TaqTm Probing-	FN	VN	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	

L'efficacité de la nouvelle analyse à détecter la résistance est caractérisée par sa sensibilité et sa spécificité. La sensibilité correspond à la probabilité d'obtenir un résultat positif (présence de la mutation) si le spécimen est résistant, alors que la spécificité réfère plutôt à la probabilité d'obtenir un résultat négatif (absence de la mutation) si le spécimen est sensible à l'antibiotique.

$$\text{Sensibilité} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

$$\text{Spécificité} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

Afin de compléter l'évaluation d'une nouvelle analyse, il est également important de considérer sa valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN). La VPP représente la probabilité que le spécimen soit réellement résistant lorsque le résultat est positif. À l'inverse, la VPN représente la probabilité que le spécimen soit réellement sensible lorsque le résultat est négatif.

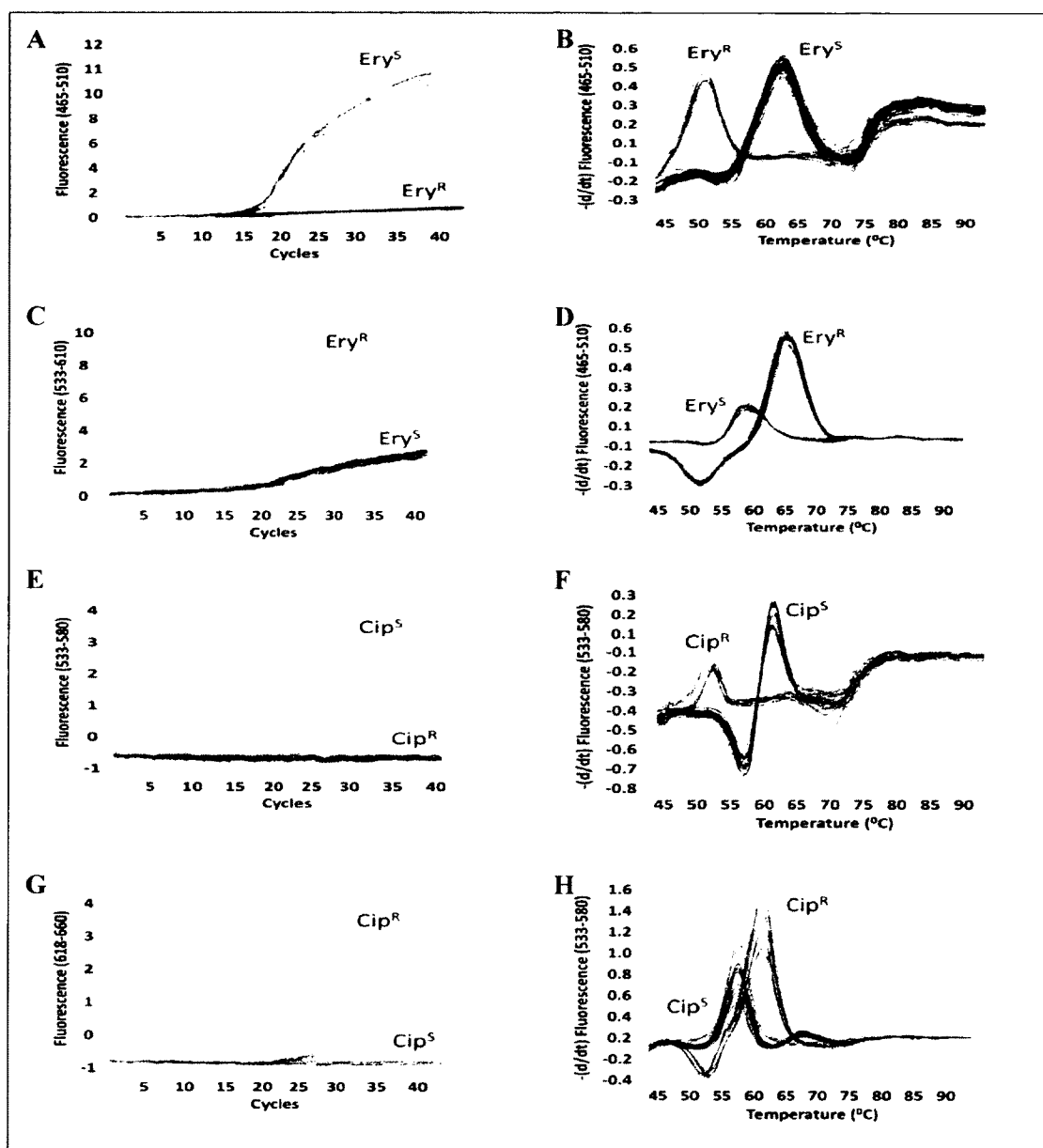
$$\text{Valeur prédictive positive} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})$$

$$\text{Valeur prédictive négative} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})$$

Contrairement à la sensibilité et à la spécificité, l'interprétation des valeurs prédictives doit se faire en regard à la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans la population bactérienne étudiée. Quelle que soit la sensibilité ou la spécificité de l'analyse, si par exemple la prévalence de résistance est faible, la probabilité qu'un spécimen avec un résultat positif soit réellement résistant est faible. Dans ce cas, le résultat positif a de fortes chances d'être un faux positif. Inversement, si la prévalence de résistance est élevée, la probabilité qu'un spécimen avec un résultat négatif soit réellement sensible est faible.

#### 3.1.1.4.1 Calcul de la sensibilité et de la spécificité

En tout 73 spécimens de *C. jejuni* ont été soumis à l'analyse par TaqTm Probing. Il s'agit de 27 spécimens résistants à l'érythromycine (mais sensibles à la ciprofloxacine) et de 46 spécimens résistants à ciprofloxacine (mais sensibles à l'érythromycine), dont les profils de résistance ont préalablement été établis par la méthode de la CMI. Après analyse des résultats (Figure 8), le SNP de résistance A2075G a été détecté chez 23 des 27 isolats résistants à l'érythromycine (Tableau 3) et le SNP de résistance C257T a été détecté chez 35 des 46 isolats résistants à la ciprofloxacine (Tableau 4). À partir de ces données, il a été possible de calculer la sensibilité, la spécificité ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives (Tableau 5).



**Figure 8: Analyse par TaqTm Probing du profil de résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez des spécimens de *C. jejuni*.**

Un signal est produit par les sondes de type sauvage (A, B) avec des isolats de *C. jejuni* sensibles (courbes rouges), mais pas avec les isolats résistants (courbes vertes). À l'inverse, les isolats résistants (C, D) sont détectés par les sondes mutantes (courbes rouges), mais pas ceux sensibles (courbes vertes). Durant l'analyse des courbes de dénaturation post-PCR, les sondes de type sauvage (E, F) ont généré des pics de Tm plus bas avec les isolats résistants (pics rouges) qu'avec les isolats sensibles (pics verts). L'opposé est observé avec les sondes mutantes (G, H). Dans cette étude nous avons analysé 73 isolats de *C. jejuni*. Le SNP de résistance A2075G a été détecté chez 23 des 27 isolats résistants à l'érythromycine et le SNP C257T a été détecté chez 35 des 46 isolats résistants à la ciprofloxacine.

**Tableau 3: Tableau de contingence en vue de l'évaluation de la capacité du TaqTm Probing à détecter la résistance à l'érythromycine chez *C. jejuni*.**

	CMR+	CMR-	Total
TaqTm Probing	23	0	23
TaqTm Probing	4	46	50
Total	27	46	

**Tableau 4: Tableau de contingence en vue de l'évaluation de la capacité du TaqTm Probing à détecter la résistance à la ciprofloxacine chez *C. jejuni*.**

	CMR+	CMR-	Total
TaqTm Probing	35	2	37
TaqTm Probing	11	25	36
Total	36	27	

**Tableau 5: Évaluation globale de la capacité du TaqTm Probing à détecter la résistance à l'érythromycine et à la ciprofloxacine chez *C. jejuni*.**

	Erythromycine	Ciprofloxacine
Sensibilité	85%	76%
Spécificité	100%	93%
VPP	100%	95%
VNP	92%	69%

### 3.1.2 Mise au point de la méthode de détection de la résistance à l'azithromycine par PCR nichée en TaqTm Probing

Fort de notre expérience acquise pour la détection de SNP de résistance chez *C. jejuni*, nous avons entrepris de développer une méthode de PCR multiplexe nichée basée sur le TaqTm Probing, pour détecter la présence potentielle de SNP de résistance à l'azithromycine aux positions A2058C et C2611T du gène de l'ARNr 23S de *C. trachomatis* (Misyurina *et al.*, 2004).

Comme mentionné précédemment la PCR nichée se compose de deux niveaux d'amplification, c.-à-d. d'une amplification externe et d'une amplification interne. Dans le cas présent, les deux SNP recherchés dans le gène de l'ARNr 23S sont suffisamment

près l'un de l'autre pour qu'ils puissent être inclus dans une seule amplification externe. Par contre, à partir de ce produit externe, deux amplifications internes distinctes sont effectuées de façon concomitante, afin de détecter simultanément la présence (ou absence) des mutations.

Puisque les PCR seront faites sur des spécimens polymicrobiens, il est important de sélectionner des couples d'amorces ayant d'abord une bonne spécificité. Cela n'était pas aussi critique avec *C. jejuni*, car les analyses ont été faites sur des cultures pures de la bactérie.

#### 3.1.2.1 Sélection des amorces

En se servant du module ClustalW Multiple Alignment du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor, les séquences du gène de l'ARNr 23S de *C. trachomatis* ont été alignées avec celle de différentes bactéries commensales ou pathogènes retrouvées dans les sphères uro-génitale et ano-rectale, soit: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Ureaplasma urealyticum*, *C. jejuni*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *Bacteroides vulgates*, *Bifidobacterium longum* et *Gardnerella vaginalis* (Figure 9).



**A**

LactoAcidophilus	TGGTTTTAAGGTAGTGAAATTTTTGTGGGTTAGTTTGTATTGTTATGA	2040
LactoGasseri	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA	1644
StrepAgalactiae	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCCGCACGA	1972
StaphAureus	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCCGCACGA	1996
StaphEpidermidis	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCCGCACGA	1995
UreaplasmaUrealyticum	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAATCCGTCGCCCTTGA	1976
<b>Ctrachomatis</b>	<b>-GGTGCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA</b>	<b>1949</b>
HelicoPylori	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAATCCGACCTGCATGA	2057
Cjejuni	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAATCCGACCTGCATGA	2135
Ecoli	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA	2045
ProteusMirabilis	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA	1491
Ngonorrhoeae	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCCGCACGA	1968
Tpallidum	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCCGCACGA	2020
BacteroidesVulgates	-GGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA	1987
BifidoLongum	-CATCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA	2087
GardVaginalis	-CATCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTCCGACCTGCACGA	2121
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

**B**

LactoAcidophilus	TTATTTTTGTTAAGATGCGGGTTTTCCGTGATAGGACGGAAAGTTCCAT	2139
LactoGasseri	TAATACCCGTGAAGATGCGGGTTACCCGCGACAGGACGGAAAGACCCCAT	1743
StrepAgalactiae	TAGTACCTGTGAAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGAAAGACCCCAT	2071
StaphAureus	TAGTACCTGTGAAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGAAAGACCCCGT	2095
StaphEpidermidis	TAGTACCTGTGAAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGAAAGACCCCGT	2094
UreaplasmaUrealyticum	TGGTGAGGGTGAAGACGCCCTCTGGCGTGATTGGACGGAAAGACCCCAT	2075
<b>Ctrachomatis</b>	<b>TAGTAGCAGTGAAGATGCTGTTTACC</b> <b>CGCGAAAGGACGAAAGACCCCGT</b>	<b>2048</b>
HelicoPylori	TAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGT	2156
Cjejuni	TAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGT	2234
Ecoli	AACTCGCTGTGAAGATGCAGTGTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGT	2144
ProteusMirabilis	AACTCGCTGTGAAGATGCAGTGTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGT	1590
Ngonorrhoeae	AAGTGGTGTGAAGATGCAATCTACCCGCTGCTAGACGGAAAGACCCCGT	2067
Tpallidum	ATGTACCGGTAAGAAGCCGGTTACCCATAGTTAGACGGGAAGACCCCGT	2120
BacteroidesVulgates	TAGTATCGGTGAAGATGCCGATTACCCGCGATGGGACGAAAAGACCCCGT	2086
BifidoLongum	CAGTACGAGTAAAGATGCTCGTTAAGCGCAGAAGGACGAAAAGACCCCG-	2185
GardVaginalis	CAGTACGAGTAAAGATGCTCGTTAAGCGCAGAAGGACGAAAAGACCCCG-	2219
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

**Figure 9: Aligement des séquences de gène de l'ARNr 23S de différentes bactéries des sphères uro-génitales et ano-rectales.**

En (A) portion d'une région hautement conservée entre les différentes espèces. En (B) portion d'une région variable de séquence exclusive à *C. trachomatis*. Cela permet d'identifier une séquence potentielle pour une sonde de détection (en rose) du SNP de résistance aux macrolides (en rouge).

Source: Module ClustalW Multiple Alignment du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor

Ceci a permis d'identifier des régions spécifiques à *C. trachomatis* aux bordures des SNP A2058C et C2611T. Ensuite, en se servant du module OligoAnalyzer du logiciel en ligne IDT SciTools il a été possible de faire le design de 30 couples d'amorces externes, de 15 couples d'amorces internes ciblant la mutation A2058C et de 48 couples d'amorces internes ciblant la mutation C2611T. Pour s'assurer de la spécificité des différentes amorces, leurs séquences ont ensuite été comparées à celles contenues dans la base de données du *U.S. National Center for Biotechnology*

*Information* (NCBI) à l'aide du programme de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

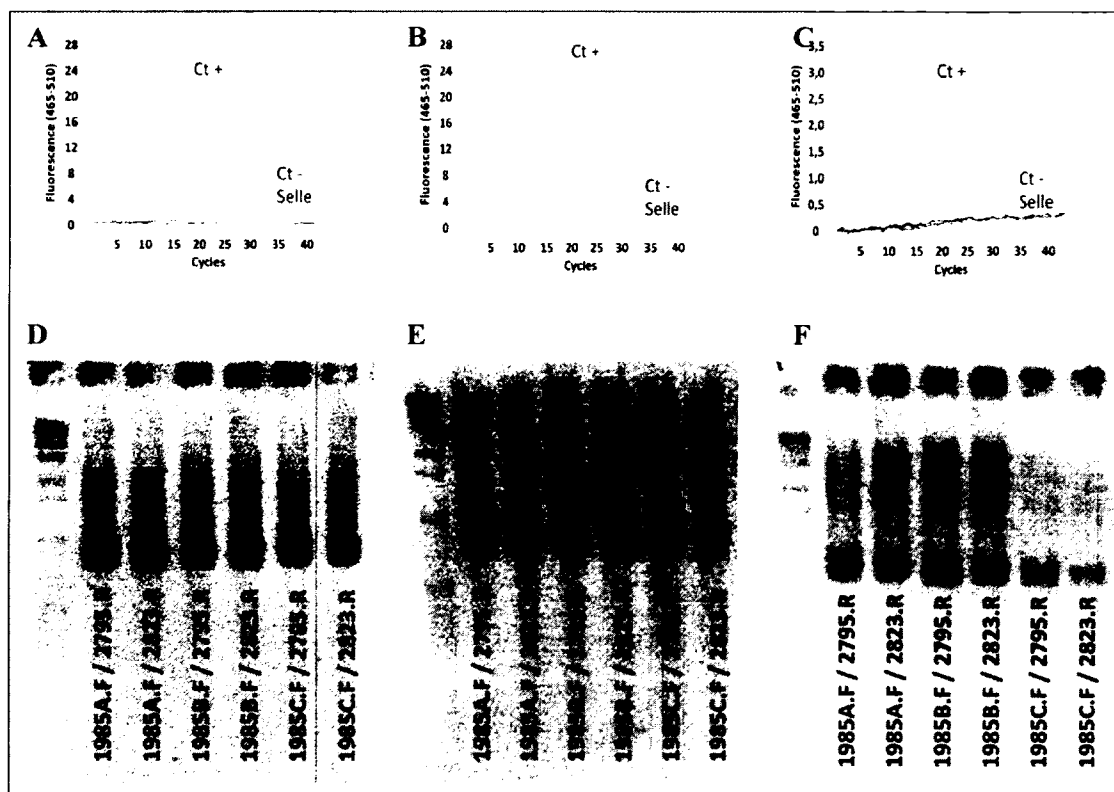
Pour vérifier expérimentalement la spécificité et la sensibilité des d'amorces, elles ont été testées dans 3 différentes PCR: l'une ayant pour cible un prélèvement positif pour *C. trachomatis*, une autre ayant pour cible un prélèvement négatif et finalement, une troisième réaction avec pour cible de l'ADN extrait de selles humaines. Puisque l'intestin humain regorge de quelque 100 000 milliards de bactéries provenant de 400 espèces, cela représente une excellente cible pour évaluer la spécificité d'amorces PCR.

### 3.1.2.2 Développement du système multiplexe par PCR nichée

#### 3.1.2.2.1 PCR externe

Parmi les 30 couples d'amorces externes testés, 6 couples ont été présélectionnés pour leur sensibilité et leur spécificité. Les PCR externes ont été comparées selon qu'elles aient été faites avec la Taq polymérase de Roche, la Taq polymérase de Qiagen ou avec une Taq polymérase maison (Figure 10). Les courbes de Cp obtenues avec la Taq polymérase de Roche (Figure 10 A) et la Taq polymérase de Qiagen (Figure 10 B) sont plus belles que celles obtenues avec la Taq polymérase maison (Figure 10 C). Toutefois, dans tous les cas, les migrations sur gel d'agarose des produits de PCR ont donné des résultats semblables, que ce soit avec la Taq polymérase de Roche (Figure 10 D), la Taq polymérase de Qiagen (Figure 10 E) ou la Taq polymérase maison (Figure 10 F).

Au final, nous avons choisi d'utiliser le couple d'amorces Ct23s1985A.F/Ct23s2823.R et la Taq polymérase de Qiagen, dans un souci de performance des PCR, mais aussi par économie vis-à-vis de la Taq polymérase de Roche. L'amplicon externe ainsi produit à une taille de 838 pb.

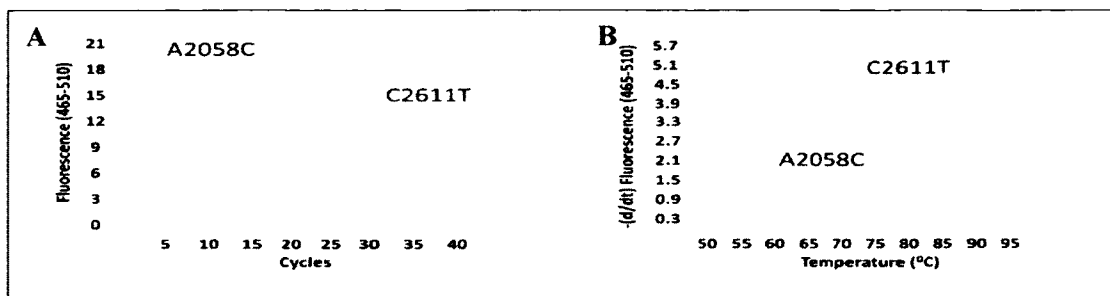


**Figure 10: Comparaison de différentes Taq polymérase pour la PCR externe.**

Pour la PCR 6 différents couples d'amorces ont été testés dans des PCR externes contenant de la Taq polymérase de Roche (A), de Taq polymérase de Qiagen (B) et une Taq polymérase maison (C). Les produits PCR de 838 pb ont été visualisés sur gel d'agarose 2% au côté d'un marqueur de poids moléculaire (1kb DNA Ladder). En (D) pour la Taq polymérase de Roche, en (E) pour celle de Qiagen et en (F) pour la Taq polymérase maison.

### 3.1.2.2.2 PCR interne

Au niveau des PCR internes, les analyses ont d'abord été faites sans sondes, afin de vérifier la sensibilité des amorces et leurs capacités à produire des résultats de PCR adéquats (Figure 11). En se basant sur les meilleures courbes d'amplification et les meilleures intensités de fluorescence, ce sont les couples formés des amorces Ct23s2001B.F et Ct23s2105.R (SNP A2058C) et Ct23s2528.F et Ct23s2683.R (SNP C2611T) qui ont été sélectionnés. Le premier couple produisant un amplicon de 104 pb et le deuxième un amplicon de 155 pb.



**Figure 11: Courbes d'amplification (Cp) et de dénaturation (Tm) des amplicons produits par les PCR internes ciblant les SNP A2058C et C2611T dans le gène de l'ARNr 23S de *C. trachomatis*.**

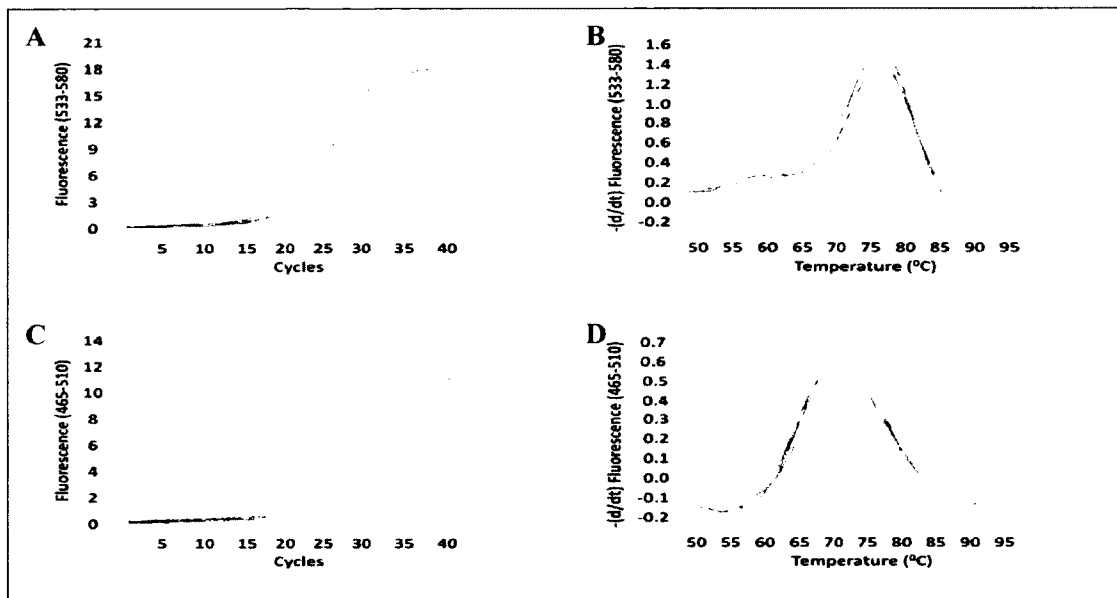
Basée sur une PCR sans sonde fluorescente, en (A) les courbes de Cp et en (B) les courbes de Tm.

Une fois le choix des amorces validé, deux sondes de détection fluorescente ciblant respectivement le SNP A2058C et le SNP C2611T ont été ajoutées aux PCR. Il s'agit de sondes complémentaires aux séquences de type sauvage. Dans le cas de la sonde ciblant le SNP A2058C, une valeur de Tm de 75,5°C est attendue lors de l'hybridation avec un spécimen sensible et une valeur de 73,2°C est attendue pour l'hybridation avec un spécimen résistant. Pour la sonde ciblant le SNP C2611T la valeur de Tm attendue pour l'hybridation avec un spécimen sensible est de 71,1°C et celle qui est attendue pour l'hybridation avec un spécimen résistant est de 68,1°C. Ces estimations des valeurs de Tm ont été calculées à l'aide du module OligoAnalyzer du logiciel IDT SciTools.

Lors du développement des sondes pour la détection de résistances aux antibiotiques chez *C. jejuni* à l'aide du TaqTm Probing, nous avons vérifié les valeurs de Tm calculées en hybridant les sondes avec des séquences cibles synthétiques avant de faire la détection chez de vrais spécimens. Il s'est avéré que les valeurs de Tm calculées par l'OligoAnalyzer, celles obtenues par l'hybridation avec des cibles synthétiques et celles issues de la détection chez de vrais spécimens, correspondaient aux mêmes valeurs. Nous avons donc hybridé les sondes de *C. trachomatis* avec des cibles synthétiques, ce qui a permis de confirmer les valeurs estimées par l'OligoAnalyzer si un spécimen est résistant.

En se basant sur les expériences antérieures avec *C. jejuni*, nous avons choisi d'employer la Taq polymérase de Roche et de conserver un ratio d'asymétrie de 1:10

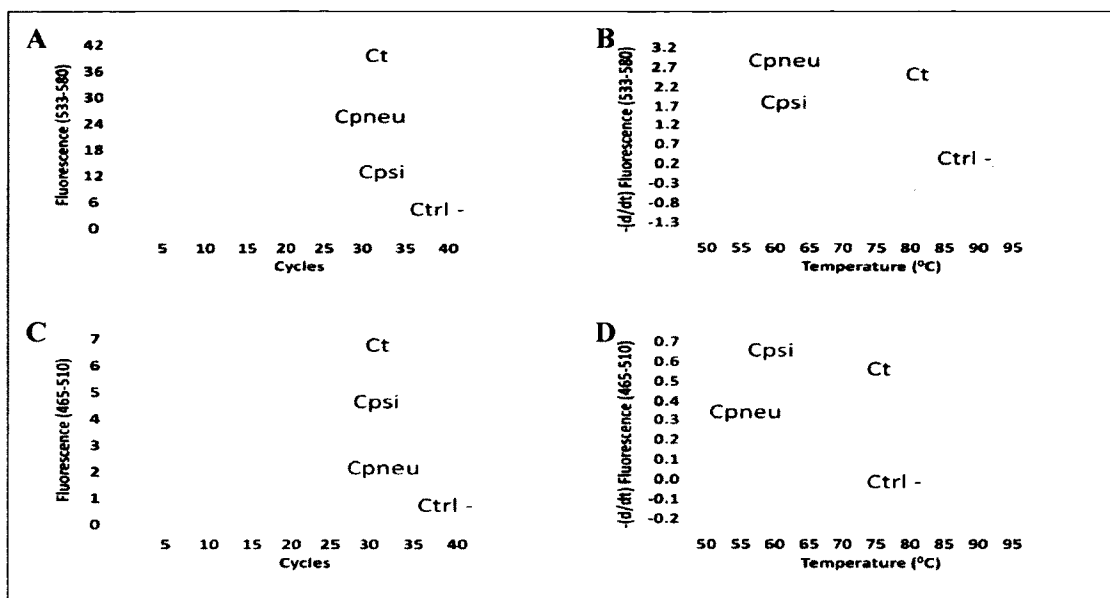
dans la concentration des amorces. Finalement, les deux PCR internes ont été combinées en une seule réaction multiplexe, afin de détecter simultanément les SNP A2058C et C2611T. Ce nouveau protocole de TaqTm Probing appliqué à *C. trachomatis* a été testé sur des extraits de souches de référence des 15 génotypes de la bactérie (Figure 12). Selon les estimations des valeurs de T<sub>m</sub>, ces spécimens sont tous sensibles à l'azithromycine, ce qui est le résultat attendu.



**Figure 12: Analyse par TaqT<sub>m</sub> Probing du profil de résistance à l'azithromycine de souches de référence des 15 génotypes de *C. trachomatis*.**

Des signaux de détection pour les courbes de Cp sont produits avec la sonde de type sauvage ciblant le SNP A2058C (A) et celle ciblant le SNP C2611T (C). De plus, les valeurs de T<sub>m</sub> correspondent dans le cas du SNP A2058C (B) et du SNP C2611T (D) à celles attendues de spécimens sensibles.

Finalement, nous avons été curieux de savoir si notre analyse pouvait avoir des applications plus larges, en distinguant entre eux *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, les trois seuls pathogènes humains de la famille des *Chlamydiaceae* (voir section: 1.3.2). En considérant la présence de SNP dans les régions d'hybridation des sondes chez *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, nous avons émis l'idée qu'il puisse être possible de les distinguer de *C. trachomatis*. Les résultats ont permis de constater qu'il était effectivement possible de distinguer *C. trachomatis* des deux autres bactéries, et ce, avec l'une et l'autre des deux sondes. Par contre, les résultats actuels ne permettent pas de distinction entre *C. pneumoniae* et *C. psittaci* (Figure 13).



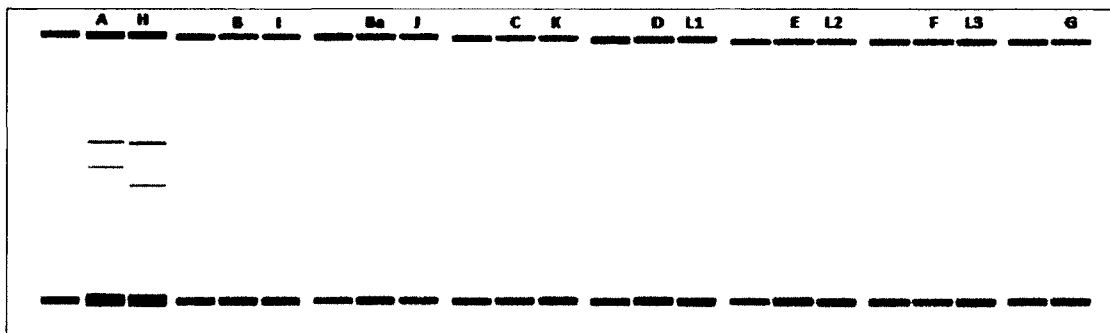
**Figure 13: Distinction entre *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, par l'analyse en TaqTm Probing du profil de résistance à l'azithromycine développé pour *C. trachomatis*.**  
 Autant avec les courbes de Cp que de Tm, il est possible de distinguer *C. trachomatis* des deux autres pathogènes au niveau de la réaction ciblant le SNP A2058C (A, B) et au niveau de celle ciblant le SNP C2611T (C, D).

### 3.1.3 Combinaison des méthodes de génotypage et de détection de la résistance à l'azithromycine

Le génotypage a été fait par une analyse en électrophorèse capillaire des fragments RFLP du gène *ompA*. Le même gène qui code pour la protéine majeure de la membrane externe et sur laquelle repose le sérotypage (voir section 1.3.2.2). Dépendamment du patron de bande que la digestion par les enzymes de restriction *AluI* et *MspI* produit, il est possible de distinguer entre eux les 15 différents génotypes de *C. trachomatis* (Figure 14).

La mise en commun des PCR externes de l'analyse RFLP du gène *ompA* et de l'analyse du gène de l'ARNr 23S par TaqTm Probing, n'a nécessité que quelques adaptations mineures. Outre l'ajustement des conditions de PCR, différentes Taq polymérases ont été comparées afin d'assurer la bonne compatibilité des deux réactions. Parmi la *iTaq* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) la Taq polymérase maison (fabriquée par Mme Catherine Desrosiers, Coordonnatrice de laboratoire), la Taq polymérase (Qiagen, USA) et la Taq polymérase de Roche (Roche Diagnostics,

Laval, QC, Canada), c'est celle de Qiagen qui a offert les meilleures courbes d'amplification et les meilleures intensités de fluorescence. Pour les PCR internes, dans le cas de l'analyse par RFLP nous avons également employé la Taq polymérase de Qiagen, alors que pour l'analyse par TaqTm Probing nous avons préféré conserver la Taq polymérase de Roche.



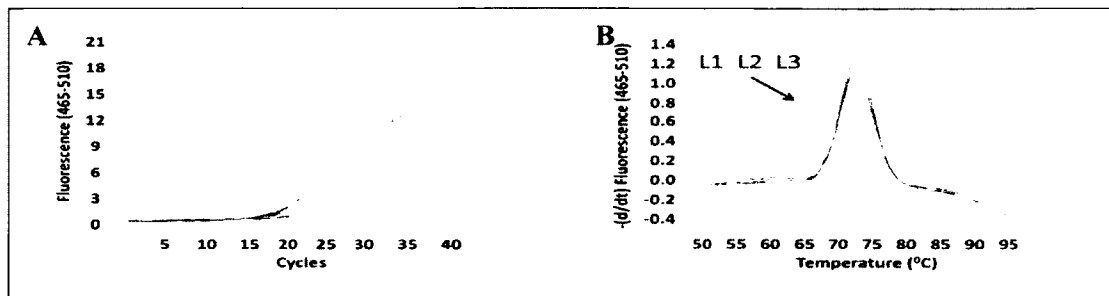
**Figure 14: Typage de souches de référence des 15 génotypes de *C. trachomatis* par analyse RFLP du gène *ompA*.**  
 Patron de restriction visualisé par électrophorèse capillaire.

### 3.1.4 Évaluation semi-quantitative de la charge bactérienne

Afin d'obtenir des valeurs de Cp comparables entre elles, il est important de ne pas employer une PCR nichée. Les deux amplifications successives ne permettent pas de conserver une linéarité adéquate dans les résultats. De plus, considérant que certains prélèvements urogénitaux puissent avoir une faible quantité de chlamydies, il est nécessaire de choisir des amorces présentant une excellente sensibilité. C'est pour cette raison que le choix s'est porté sur celles utilisées dans l'analyse diagnostique du laboratoire clinique, soit l'amorce sens CP24 et anti-sens CP27, qui détectent le plasmide cryptique présent à environ 4 copies chez *C. trachomatis* (Pickett *et al.*, 2005) plutôt que le gène de l'ARNr 23S présent à 2 copies (Misyurina *et al.*, 2004).

L'analyse des séquences des plasmides cryptiques des 15 différents génotypes de *C. trachomatis* dans la région flanquée par les amorces, a permis d'identifier un SNP de différence entre les séquences des génotypes impliqués dans le LGV (L1, L2 et L3) et les 12 autres génotypes de la bactérie. En se servant d'une sonde dont la séquence

recoupe ce SNP (Figure 15), il a été possible de contre vérifier que les diagnostics d'ITS causées par *C. trachomatis* n'étaient pas des cas de LGV.



**Figure 15: Courbes d'amplification (Cp) et de dénaturation (Tm) des amplicons produits par la PCR ciblant une région du plasmide cryptique de *C. trachomatis*.**

Des signaux de détection pour les courbes de Cp sont produits pour l'ensemble des 15 souches de références analysées (A). Les valeurs des courbes de Tm (B) correspondent à celles attendues, alors qu'il est possible de distinguer les génotypes impliqués dans le LGV (premier pic) des autres génotypes (deuxième pic).

### 3.2 PROJET: Résultats de l'investigation des causes bactériennes des échecs de traitement de la chlamydie génitale

#### 3.2.1 Portrait des cas cliniques

Le génotype de chacun des prélèvements urogénitaux a été établi par une analyse du profil RFLP en électrophorèse capillaire tel que décrit précédemment. Les résultats du génotypage ont ensuite été inscrits dans la base de données, contenant l'âge des patients, ainsi que les dates de leurs différentes consultations médicales en rapport avec la chlamydie génitale.

À l'aide du logiciel de programmation et de calcul numérique MatLab (Version R2008b), les informations contenues dans la base de données ont été analysées par un algorithme matriciel. Après la classification des données selon les critères<sup>19</sup> présentés dans le Tableau 6, nous avons pu recenser 83 cas d'échec de traitement, 22 cas de persistance et 139 cas de réinfection. Par contre, il faut garder à l'esprit que les

<sup>19</sup> Critères adaptés du *CDC Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010* (<http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/chlamydial-infections.htm>)

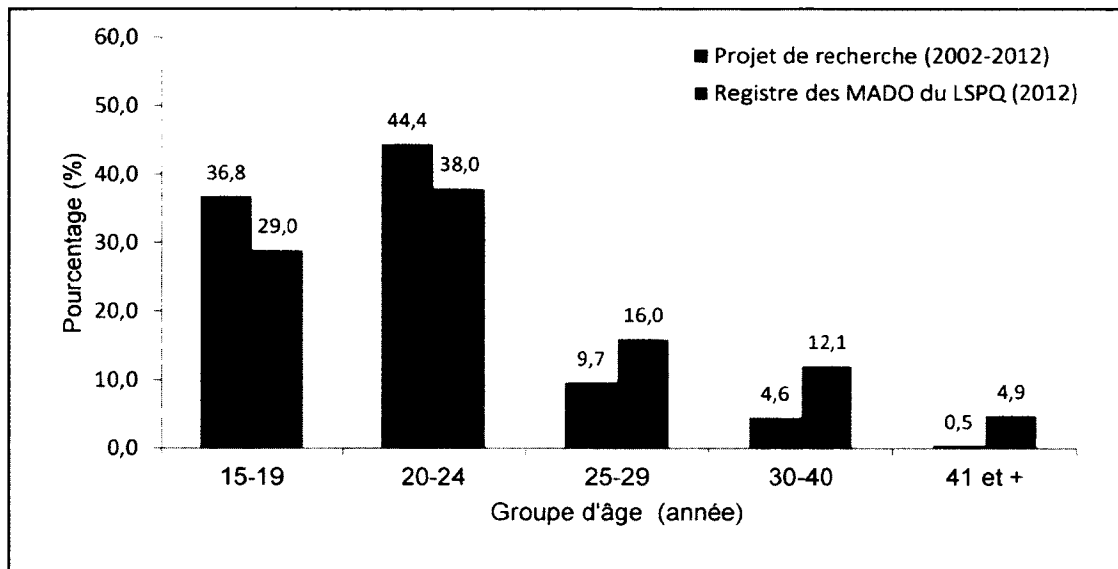


échecs correspond à la somme de vrais échecs, c.-à-d. une infection qui ne s'est pas résolue par l'antibiothérapie, auxquelles s'ajoute de possibles faux positifs s'il y a réinfections par un partenaire non traité ou une infection par un nouveau partenaire infecté par le même génotype. Il va de même avec les cas d'infection persistante qui peuvent être confondues avec des réinfections par le même génotype, malgré l'immunité qui devrait protéger partiellement contre les réinfections, si bien sûr l'infection n'a pas été traitée avant la montée d'une réponse immune.

**Tableau 6: Classification des situations cliniques des patients en cas d'échec de traitement, de réinfection ou de persistance.**

SITUATIONS CLINIQUES	CRITÈRES DE CLASSIFICATION	
Échec de traitement	Intervalle de <u>moins d'un an</u> entre deux prélèvements	<u>Même</u> génotype dans les deux prélèvements
Infection persistante	Intervalle de <u>plus d'un an</u> entre deux prélèvements	<u>Même</u> génotype dans les deux prélèvements
Réinfection		<u>Pas le même</u> génotype dans les deux prélèvements

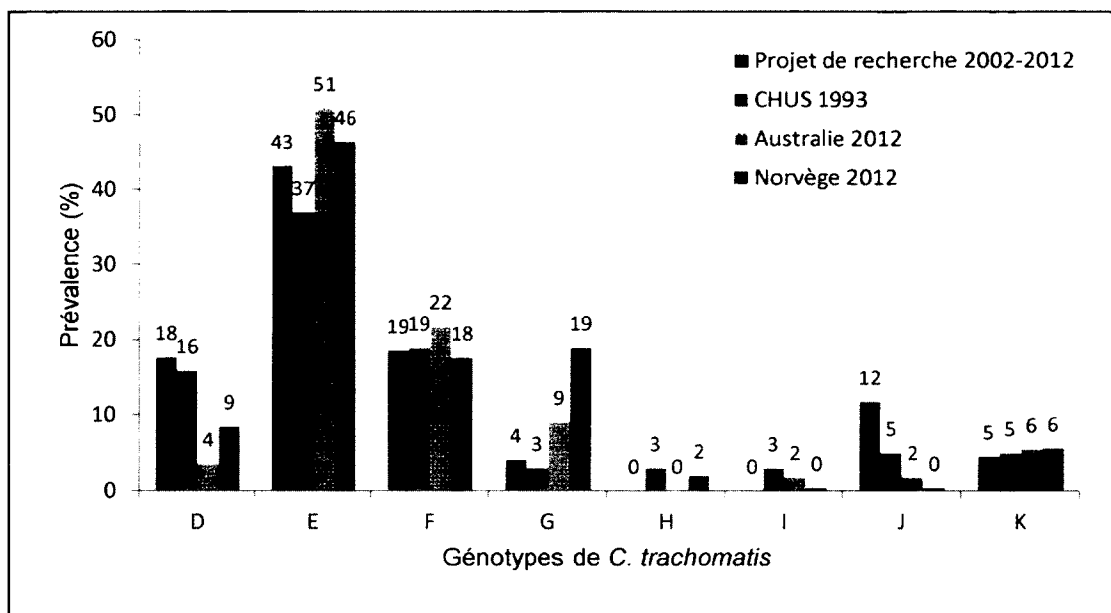
Une première comparaison a permis d'établir que la prévalence moyenne des cas de chlamydie génitale au travers des différents groupes d'âge de notre cohorte entre les années 2002 et 2012, est semblable aux données extraites du Registre des MADO du LSPQ pour l'année 2012 (Figure 16).



**Figure 16: Distribution des cas de chlamydirose génitale en fonction de différents groupes d'âge.**

Source: Registre des maladies à déclaration obligatoire. LSPQ. extraction en date du 16 avril 2012.

Dans un deuxième temps, la prévalence moyenne des différents génotypes de *C. trachomatis* retrouvés dans les 506 prélèvements urogénitaux de notre étude, a été comparée aux résultats de trois études antérieures (Figure 17). La première a été réalisée au CHUS en 1993 (435 prélèvements urogénitaux) et les deux autres ont toutes deux été réalisées en Australie (2937 prélèvements urogénitaux) (Walker *et al.*, 2012) et en Norvège (248 prélèvements urogénitaux) (Gravningen *et al.*, 2012) en 2012.



**Figure 17: Prévalence moyenne des génotypes de *C. trachomatis* associés aux cas de chlamydie génitale rapportés par quatre différentes études.**

L'utilisation du test de Chi2 (aussi appelé  $\chi^2$ ) a d'abord permis évaluer s'il y avait une différence entre la distribution des résultats de notre étude et celle qui a été réalisée en 1993. Le test de Chi2 sert à déterminer si les observations faites pour un groupe donné ont une différence statistiquement significative avec les observations faites sur un autre groupe. Pour ce faire, le test de Chi2 confronte une hypothèse dite nulle ( $H_0$ ) qui présume qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux distributions, à une hypothèse alternative ( $H_1$ ) qui contredit  $H_0$  au profit d'une différence statistiquement significative entre les deux distributions. La valeur obtenue par un test de Chi2 représente l'écart entre les observations faites dans les deux groupes. Ce « Chi2 calculé » est ensuite comparé à un « Chi2 théorique », dont la valeur dépend du nombre de données qui sont analysées et du pourcentage d'erreur accepté ( $\alpha$ ). Le pourcentage d'erreur accepté est généralement de 5% et correspond au risque de rejeter à tort  $H_0$  alors qu'elle est vraie. De cette façon, si la valeur de Chi2 calculé est plus petite que celle du Chi2 théorique, on accepte  $H_0$ . Inversement, si la valeur de Chi2 calculé est plus grande que celle du Chi2 théorique,  $H_0$  est rejeté au profit de  $H_1$ . Ainsi, à savoir s'il y a une différence statistiquement significative entre la distribution des résultats de notre étude et celle qui a été réalisée en 1993, la valeur du Chi2 calculé est de 9,1, alors que celle du Chi2 théorique est de 14,1. Il n'y a donc pas

de différence dans la prévalence des différents génotypes en Estrie entre 1993 et 2012. Toutefois, même si cela ne cause pas de différence statistiquement significative, on note néanmoins que la prévalence du génotype J a doublé durant cette période.

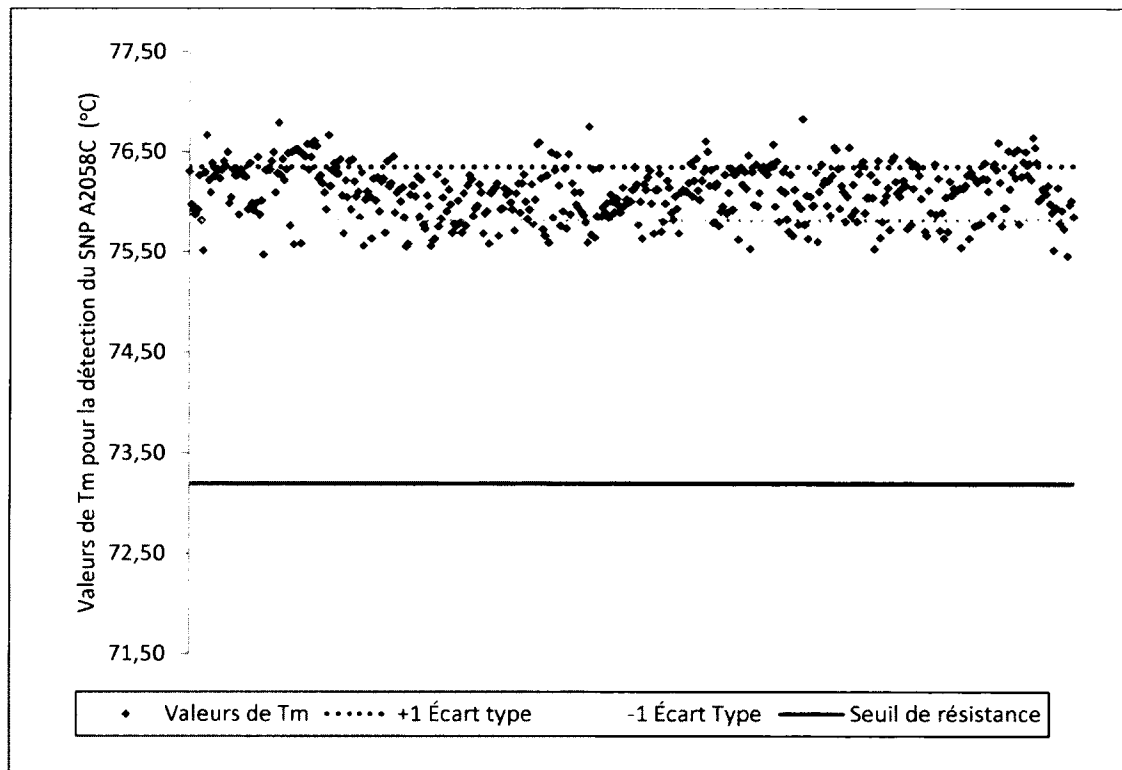
Sinon, hormis quelques variations, les résultats de ces quatre études sont globalement comparables. Par contre, on peut noter une différence statistiquement significative entre la prévalence du génotype D en Estrie (1993 et 2012) et celles observées en Australie et en Norvège ( $\chi^2$ : 6,8 > 3,8;  $\alpha=0,05$ ). C'est également le cas avec la prévalence du génotype G en Norvège, comparativement à celles rapportées par les trois autres études ( $\chi^2$ : 11,4 > 3,8;  $\alpha=0,05$ ). Un constat similaire se pose pour le génotype J lorsqu'on compare la prévalence moyenne de 12% en Estrie entre 2002 à 2012, aux prévalences Australienne (Walker *et al.*, 2012), Norvégienne (Gravningen *et al.*, 2012) et à celle de l'Estrie en 1993 (Frost *et al.*, 1993) ( $\chi^2$ : 10,2 > 3,8;  $\alpha=0,05$ ).

### 3.2.2 Détection de résistance à l'azithromycine dans les spécimens cliniques

Afin de faciliter l'analyse des résultats et leurs présentations globales, les valeurs de  $T_m$  obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance A2058C et C2611T ont été rapportées graphiquement (Figures 18 et 19). Il appert que les valeurs moyennes des  $T_m$  pour la détection des SNP A2058C et C2611T (Tableau 7) sont respectivement de 76,1°C et de 71,1°C, ce qui correspond aux valeurs estimées à quelques centièmes de degré près. Dans le cas des valeurs de  $T_m$  pour la détection du SNP A2058C, l'écart-type est de 0,27°C ce qui traduit par un coefficient de variation de 0,35%. De façon similaire, l'écart-type pour les valeurs de  $T_m$  de la détection du SNP C2611T est de 0,24°C et correspond à un coefficient de variation de 0,34%.

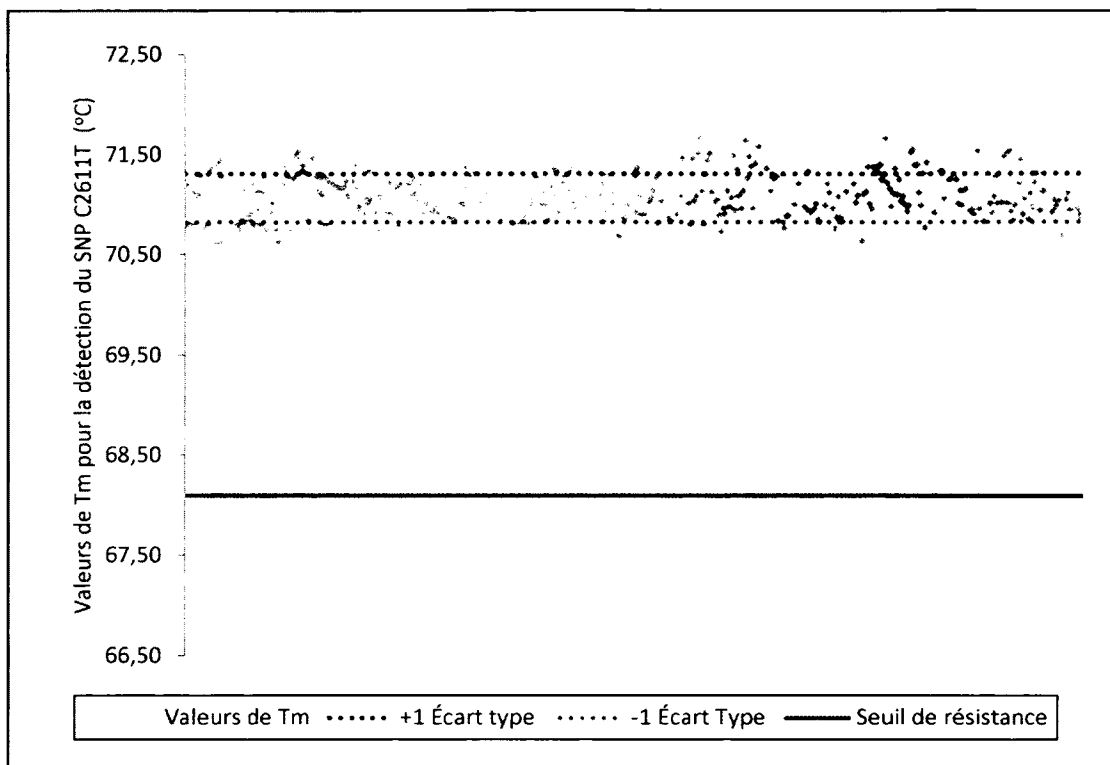
**Tableau 7: Évaluation de la distribution des valeurs de  $T_m$  obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance A2058C et C2611T dans les 506 prélèvements urogénitaux de *C. trachomatis*.**

	A2058C	C2611T
Tm moyen	76,1°C	71,1°C
Écart-type	0,27°C	0,24°C
Coefficient de variation	0,35%	0,34%



**Figure 18: Valeurs de Tm obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance A2058C.**

L'ensemble des spécimens ont été identifiés comme étant sensible à l'azithromycine au niveau de SNP de résistance A2058C, alors que la valeur de Tm moyenne est de 76,1°C avec un écart-type de  $\pm 0,27^\circ\text{C}$  et coefficient de variation de 0,35%.

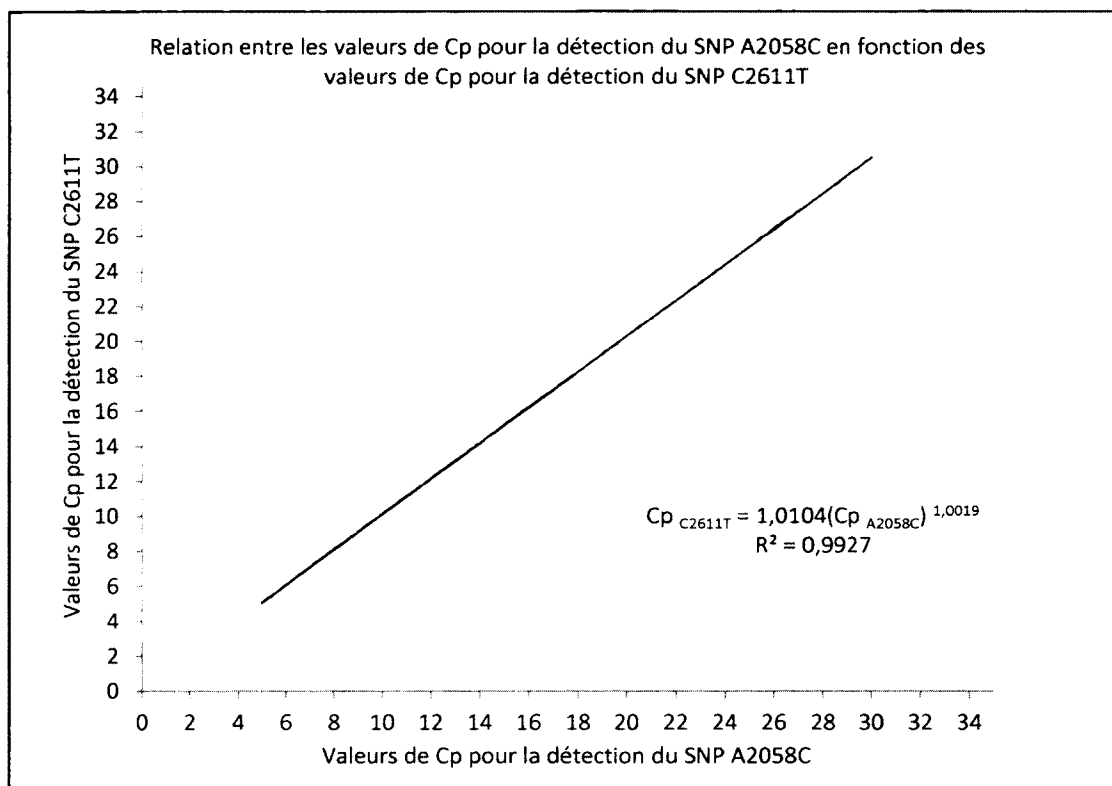


**Figure 19: Valeurs de Tm obtenues pour la détection par TaqTm Probing des SNP de résistance C2611T.**

L'ensemble des spécimens ont été identifiés comme étant sensible à l'azithromycine au niveau de SNP de résistance C2611T, alors que la valeur de Tm moyenne est de 71,1°C avec un écart-type de  $\pm 0,24^\circ\text{C}$  et coefficient de variation de 0,34%.

Par contre, l'analyse des données ne permet pas d'identifier de potentiels SNP de résistance aux positions A2058C et C2611T. Aucun mésappariement d'hybridation entre les spécimens analysés et les sondes complémentaires aux séquences de type ne se sont produits, cela autant à la température de 73,2°C pour le SNP A2058C, qu'à la température de 68,1°C pour le SNP C2611T (voir section 3.1.2.2.2 pour l'estimation des valeurs de Tm de résistances).

Finalement, considérant que les deux PCR internes de l'analyse par TaqTm Probing ciblent le même gène et qu'elles se font à partir du même produit de PCR externe, il est logique de croire que les deux Cp associés à un même échantillon sont très similaires l'un de l'autre. Grâce à ce grand échantillon analysé, nous avons pu mettre en relation les valeurs de Cp pour les deux PCR internes, afin de comparer leur rendement d'amplification respectif (Figure 20).



**Figure 20: Comparaison du rendement d'amplification entre la PCR interne ciblant le SNP A2858C et celle ciblant le SNP C2611T.**

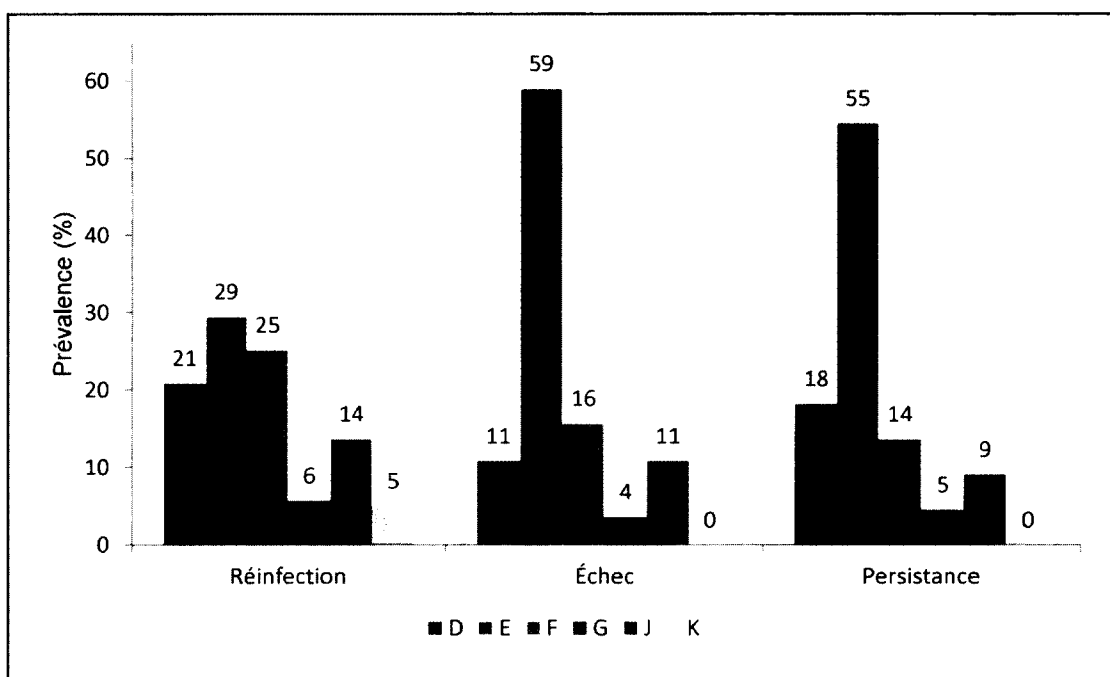
En fonction des résultats obtenus, nous pouvons observer que les deux PCR ont un rendement quasiment identique. Alors que la PCR interne ciblant le SNP A2858C fait 1 cycle d'amplification, la PCR interne ciblant le SNP C2611T en fait 1,01. Le coefficient de corrélation montre également une excellente linéarité entre les valeurs de Cp des deux réactions.

Le coefficient de corrélation de 0,9927 montre une excellente linéarité dans les valeurs de Cp des deux PCR. Pour ce qui est du rendement d'amplification, les deux réactions sont toutes aussi performantes l'une comme l'autre. En fait, la formule associée à la droite de régression permet de calculer que lorsque la PCR ciblant le SNP A2058C fait 1 cycle d'amplification, la seconde ciblant le SNP C2611T en fait 1,01. Aussi bien dire qu'il n'y a pas de différence entre les deux réactions.

### 3.2.3 Génotypage des spécimens cliniques

Maintenant, en comparant séparément les cas d'échec de traitement et d'infection persistante (les cas) avec les cas de réinfections (les témoins) (Figure 21), il est possible d'établir un lien statistiquement significatif entre le génotype E et les cas d'échec de traitement ( $\text{Chi}^2: 18,8 > 3,8; \alpha=0,05$ ), ainsi qu'entre ce même génotype et les cas

d'infection persistante ( $\text{Chi}^2: 5,4 > 3,8; \alpha=0,05$ ). Par contre, le test de  $\text{Chi}^2$  se limite uniquement à établir s'il y a un lien statistiquement significatif entre deux variables. C'est à l'aide des analyses statistiques complémentaires qu'il est possible de mesurer la force de l'association entre les infections par le génotype E et les cas d'échec de traitement et de persistance. Or, il appert qu'il y a respectivement 3,4 et 2,5 fois plus de risque qu'une infection par le génotype E évolue vers un échec de traitement ou une infection persistante. Ce calcul du risque que représente une infection par le génotype E se fait en comparant le niveau d'exposition au génotype E chez les patients qui ont présenté des cas d'échec de traitement ou de persistance, à l'exposition chez ceux ayant eu plutôt des réinfections. Il s'agit là d'un test simple, mais qui est très fréquemment employé en épidémiologie pour mesurer la force d'association entre une exposition à un facteur quelconque et un état de santé.

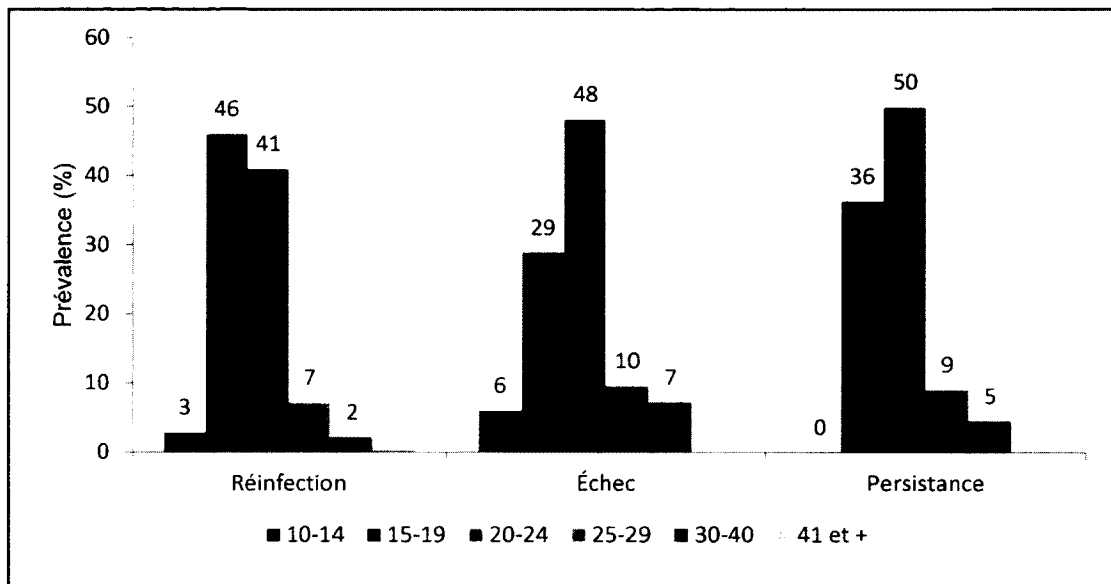


**Figure 21: Prévalence moyenne des différents génotypes de *C. trachomatis* associés aux épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante.**

Autre fait intéressant, les différents épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante qui ont été recensés, ne sont pas corrélés avec l'âge des patients (Figure 23). Les différentes situations cliniques se distribuent aléatoirement au



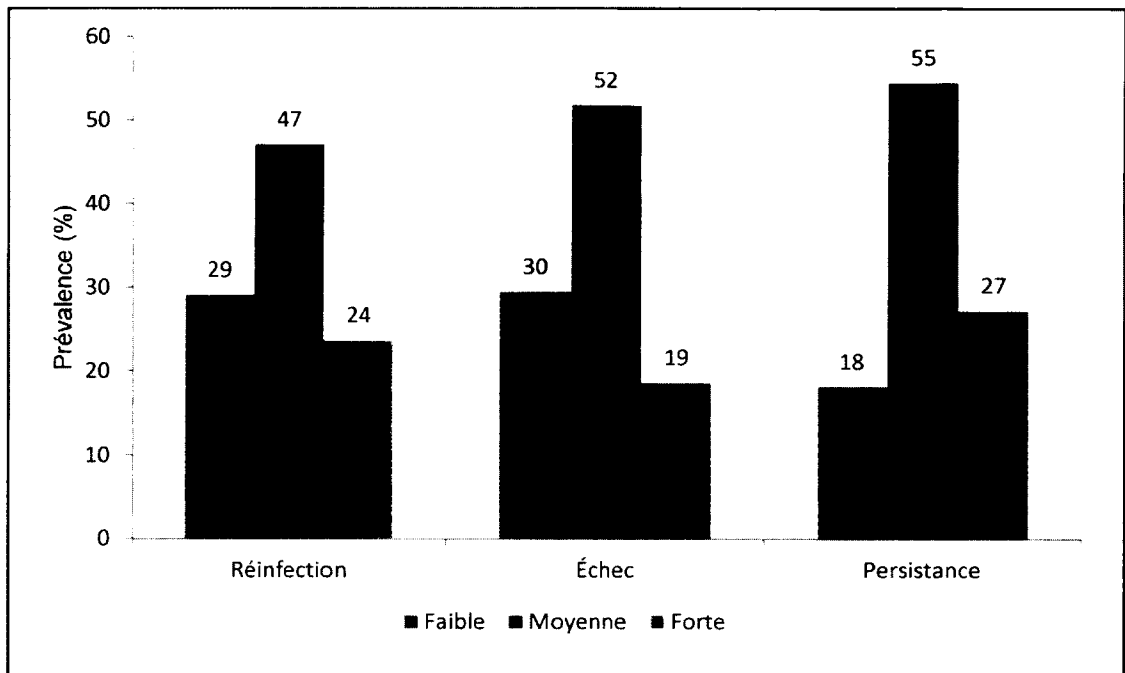
travers des différents groupes d'âge, sans qu'il y ait de lien statistiquement significatif entre l'une d'entre elles et un groupe d'âge ( $\text{Chi}^2: 11,4 < 18,3; \alpha=0,05$ ).



**Figure 22: Proportion que représentent les différents groupes d'âge dans les épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante.**

### 3.2.4 Évaluation de la charge bactérienne dans les spécimens cliniques

Il en va de même pour le lien entre une charge bactérienne faible, moyenne ou forte et l'une ou l'autre des quatre situations cliniques analysées (Figure 23), alors qu'aucun lien statistiquement significatif n'a pu être montré ( $\text{Chi}^2: 4,2 < 9,5; \alpha=0,05$ ).



**Figure 23: Proportion des épisodes d'échec de traitement, de réinfection et d'infection persistante dont les prélèvements présentaient une charge bactérienne faible, moyenne ou forte.**

## DISCUSSION

### 4.1 Rappel des objectifs

L'incidence de la chlamydie génitale, la MADO la plus rapportée au Canada, présente une hausse constante de 170% depuis 1997. Une étude américaine a sonné l'alarme en 2005 (Golden *et al.*, 2005), en rapportant que de 10 à 15% des patients traités pour la chlamydie génitale étaient toujours infectés après la fin du traitement.

Au-delà des causes dites environnementales dans la Triade épidémiologique qui caractérise la dynamique infectieuse de cette ITS, comme par exemple les contacts sexuels post-antibiothérapie avec partenaire infecté, nous avons émis l'hypothèse que des causes dites bactériennes puissent être responsables des cas d'échec de traitement de la chlamydie génitale. La charge bactérienne de départ peut être plus élevée dans un cas d'infection par rapport à un autre. Il est également possible que des souches particulières soient plus aptes à adopter un état de persistance, permettant plus facilement à la bactérie de se protéger des antibiotiques et d'échapper à la réponse immunitaire. Finalement, bien que l'antibiothérapie actuelle soit performante, l'utilisation presque exclusive d'azithromycine pour traiter la chlamydie génitale peut mener au développement de résistance. Pour vérifier ces hypothèses, 506 prélèvements urogénitaux conservés au CHUS et provenant de 204 patients ayant eu deux épisodes ou plus de chlamydie génitale entre 2002 et 2012, ont été analysés de façon rétrospective dans une étude de type cas-témoins.

### 4.2 Portrait des cas cliniques

Une analyse de la distribution des cas de récurrence de chlamydie génitale en fonction de différents groupes d'âge de notre cohorte, a permis d'établir qu'elle est comparable à ce qui est observé pour l'ensemble des infections du territoire québécois: Plus de 80% des cas se retrouvent dans le groupe de 15 à 24 ans, avec une prévalence

maximale chez les 20-24 ans<sup>20</sup>. En se basant sur les critères présentés au Tableau 6 (voir section 3.2.1), nous avons pu recenser dans notre cohorte 83 cas d'échec de traitement, 22 cas de persistance et 139 cas de réinfection. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre l'une ou l'autre de ces 3 situations cliniques et l'âge des patients. Elles se distribuent plutôt aléatoirement dans chacun des groupes d'âge.

#### 4.2.1 Détection de résistance dans les spécimens cliniques

À ce jour, seuls quelques cas cliniques d'échec de traitement ont pu être associés à un phénotype de résistance à l'azithromycine par la méthode de la CMI (Somani *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Horner., 2006). Cette méthode très fastidieuse et laborieuse nécessite chez *C. trachomatis* la culture de la bactérie sur des cultures cellulaires contenant différentes concentrations d'antibiotiques (Ljubin-Sternak *et al.*, 2013). De ce fait, la méthode de la CMI n'est pas employée de façon routinière dans les laboratoires cliniques, mais plutôt dans des études qui sont basées sur un petit nombre de spécimens cliniques. Néanmoins, le séquençage des spécimens cliniques résistants a révélé des mutations ponctuelles (SNP) dans la séquence du gène de l'ARNr 23S (Misyurina *et al.*, 2004). Or, il s'avère que la bactérie *C. jejuni* emploie principalement un mécanisme reposant sur des SNP dans le gène de l'ARNr 23S pour résister à l'érythromycine (dont l'azithromycine fait partie de la même famille d'antibiotique) et dans les gènes cibles de la ciprofloxacine (Iovine, 2013). Bénéficiant d'une importante collection de spécimens de *C. jejuni* exprimant un phénotype de résistance à ces deux antibiotiques, il a été possible de mettre au point une méthode de détection moléculaire par PCR en temps réel que nous avons nommée TaqTm Probing. Cela nous a permis d'établir que le SNP A2075G (ARNr 23S) était présent chez 85% de nos spécimens résistants à l'érythromycine et que le SNP C257T (gène *gyrA*) était présent à 76% chez les spécimens résistants à la ciprofloxacine. Des résultats qui reflètent le caractère dominant des mutations ponctuelles parmi les mécanismes de résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez *C. jejuni*. Pour ce qui est des spécimens exprimant un phénotype de résistance à l'érythromycine ou à la ciprofloxacine non médié par les SNP

---

<sup>20</sup> Registre des maladies à déclaration obligatoire, LSPQ, extraction en date du 16 avril 2012

que nous avons ciblés, cela peut être causé par d'autres SNP, mais aussi par une pompe à efflux ou une diminution de la perméabilité membranaire (Iovine, 2013). De plus, la grande spécificité de la méthode (100% pour la détection de SNP de résistances dans le gène de l'ARNr 23S et 93% pour la détection de SNP de résistances dans le gène *gyrA*) indique qu'il est très peu probable d'obtenir un résultat faussement négatif.

Puisque l'évaluation du TaqTm Probing appliqué à la détection de SNP de résistances dans le gène de l'ARNr 23S de *C. jejuni* a permis d'établir une très bonne sensibilité (85%) de la méthode et une excellente spécificité (100%), nous l'avons ensuite appliqué à la détection de potentiels SNP de résistance aux positions A2058C et C2611T dans le gène de l'ARNr 23S de *C. trachomatis*. Bien qu'aucun cas de résistance n'ait été observé, cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'autres mécanismes impliqués. Certains auteurs ont avancé l'idée que des mutations au niveau des protéines ribosomales L4 et L22 puissent également être une cause de résistance à l'azithromycine (Binet & Maurelli, 2005). En outre, dans un contexte de résistances hétérotypiques, si la majorité des chlamydies présentes lors d'une infection active sont sensibles à l'azithromycine, la portion qui est résistante et qui persiste après l'antibiothérapie, pourrait se retrouver en deçà de la limite de détection diagnostique (Somani *et al.*, 2000) et conduire à un test de contrôle post-antibiothérapie faussement négatif (Somani *et al.*, 2000). Malgré tout, les phénomènes de résistances hétérotypiques décrits chez *C. trachomatis* restent encore largement méconnus et pourraient conduire à une meilleure compréhension des cas d'échec de traitement et d'infection persistante.

Il n'est pas non plus exclu que les observations de résistance en laboratoire soient dues à une forme d'adaptation des chlamydies aux conditions de cultures *in vitro* et que cela n'ait pas de lien avec l'infection clinique (Borges *et al.*, 2013). Il s'agit d'ailleurs d'un phénomène observé chez de nombreuses espèces bactériennes, comme en témoigne, par exemple, l'acquisition spontanée de résistance à la vancomycine chez certaines souches de SARM cultivées *in vitro* (Noto *et al.*, 2008).

Ainsi, bien que cette étude n'est pas permis d'observer de résistances associées aux SNP A2058C et C2611T, il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'un mécanisme parmi

d'autres et que des études devront être faites pour mieux caractériser les phénomènes de résistance chez *C. trachomatis*. Le Dr Frost propose d'ailleurs de séquencer les souches persistantes afin d'explorer d'autres mécanismes possibles.

De plus, grâce à l'approche par TaqTm Probing, il aurait été possible de détecter d'autres SNP aux voisinages des positions 2058 et 2611. Le mésappariement nucléotidique que cela aurait créé entre la sonde et la séquence sur laquelle elle s'hybride, aurait eu pour effet d'abaisser la valeur des pics de Tm. Considérant la longueur de la sonde, cela permet d'étendre la portée de nos conclusions, en affirmant que nos spécimens cliniques ne sont pas non plus porteurs de SNP dans l'ARNr 23S entre les nucléotides 2045 et 2075 et entre les nucléotides 2601 et 2627. Les SNP A2057G et A2059G, identifiés plus marginalement comme de potentiels SNP de résistance aux macrolides (Zhu *et al.*, 2010) ne sont donc pas en cause non plus.

Aussi, lorsqu'on réfère au variant suédois (nvCT), il apparaît que cette souche est devenue dominante en Suède, sans pour autant se disperser significativement dans d'autre pays (Herrmann *et al.*, 2008). Contrairement aux maladies à transmission aérienne, telles que l'influenza ou la rougeole par exemple, qui peuvent facilement se propager d'un individu à l'autre sans qu'il y ait de lien particulier entre eux, la transmission des souches associées aux différentes ITS est plutôt tributaire de « réseaux sexuels » (Herrmann, 2007). Tout comme pour le nvCT qui est resté confiné au réseau sexuel suédois (Herrmann *et al.*, 2008), il est possible que des souches résistantes de *C. trachomatis* soient présentes dans des réseaux sexuels hors de l'Estrée. C'est d'ailleurs un phénomène qui a été observé chez la souche de *N. gonorrhoeae* H041 résistante au ceftriaxone et qui est surtout présente en Asie du Sud (Ohnishi *et al.*, 2011).

#### **4.2.2 Évaluation de la charge bactérienne dans les spécimens cliniques**

Sous la forme infectieuse extracellulaire (corps élémentaires), les chlamydies sont naturellement résistantes aux antibiotiques puisqu'elles sont métaboliquement inactives (Binet & Maurelli, 2005). Si la charge bactérienne est élevée lors d'une infection, il y a un risque que l'antibiotique ne puisse pas éliminer complètement

l'infection, car la vitesse d'élimination de l'antibiotique peut être plus rapide que la vitesse de disparition des corps élémentaires. Considérant le caractère fréquemment asymptomatique de l'infection (Magbanua *et al.*, 2007), il est fort possible que les personnes ainsi traitées, mais encore infectées, n'aillent pas consulter leur médecin à nouveau puisqu'ils n'ont pas conscience de l'infection. Celle-ci pourra donc être transmise à d'autres personnes et éventuellement remontera le tractus uro-génital et pourra évoluer vers un état de persistance et d'inflammation chronique.

Nous avons donc cherché à savoir s'il pouvait y avoir un lien associatif entre la charge bactérienne des spécimens et l'une des 3 situations cliniques susmentionnées. Puisque les spécimens cliniques sont lysés et qu'il n'est donc pas possible d'établir la charge bactérienne par la méthode des UFC, la charge bactérienne a été évaluée par PCR en temps réel. Pour s'assurer d'une excellente sensibilité nous avons ciblé la même séquence du plasmide cryptique de *C. trachomatis* que celle qui est ciblée par l'analyse diagnostique au CHUS (AMPLICOR CT/NG Test, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada)

Par contre, en considérant le caractère très variable des spécimens cliniques, il devient plus ardu de mettre au point une méthode de quantification précise. Une évaluation approximative de la charge bactérienne se présente alors comme une alternative intéressante, comme cela a été le cas dans une étude environnementale sur *Coxiella burnetii*, un pathogène intracellulaire obligatoire responsable de la fièvre Q (Kersh *et al.*, 2013). En se basant sur le fait que plus le Cp est petit et plus la quantité d'ADN cible est grande, les spécimens cliniques ont été classés arbitrairement selon qu'ils aient une charge bactérienne faible ( $C_p \geq 35$ ), moyenne ( $C_p \geq 30$  mais  $< 35$ ) ou forte ( $C_p < 30$ ). Des valeurs de Cp relativement élevées ont été choisies, car les niveaux de chlamydiae dans les spécimens cliniques sont souvent faibles et à l'aide de ces valeurs, il a été possible de diviser notre cohorte en trois groupes similaires.

L'analyse statistique de Chi2 n'a montré aucune corrélation entre une charge bactérienne donnée et l'une ou l'autre des 3 situations cliniques. Seulement, les spécimens cliniques de notre cohorte rétrospective n'avaient pas été expressément prélevés de façon standardisée, afin qu'ils soient quantitativement comparables.

Un prélèvement superficiel de l'endocol utérin rapportera moins de bactéries qu'un prélèvement sur toute la surface. De même, la quantité de bactéries présentes par ml dans les prélèvements urinaires dépendra aussi du temps écoulé entre les mictions et du volume recueilli. Aussi, comme la plupart des cas de chlamydie génitale sont asymptomatiques, ils sont bien souvent détectés au hasard lors d'examen de routine. Si le dépistage à lieu au début de l'infection il y aura certainement plus de chlamydie que s'il est fait après quelques mois d'infection. Vu la taille de notre cohorte, nous avons postulé que la variabilité dans les prélèvements sera distribuée de façon aléatoire et qu'il aurait été possible alors de voir un effet dû à la charge bactérienne s'il y en avait un. Le fait de ne pas en voir n'indique pas l'absence possible d'un tel lien, mais plutôt que la méthodologie de prélèvement ne permet pas de l'affirmer ou de l'infirmer avec certitude. En revanche, si une corrélation statistiquement significative avait été observée, malgré les variations dans les prélèvements de spécimens, il aurait été possible de conclure à une forte plausibilité de cette hypothèse, d'autant plus que d'autres auteurs ont pu faire des liens entre la charge bactérienne et le succès du traitement contre *C. trachomatis* (Horner, 2006).

#### 4.2.3 Génotypage des spécimens cliniques

L'épidémiologie moléculaire offre une approche très performante afin d'étudier le rôle d'un génotype particulier dans le changement de dynamique d'une maladie infectieuse. Ce fut entre autres le cas avec le SARM (Enright, 2003) et le BORSA (Zierdt *et al.*, 1992) chez *S. aureus*, ou encore avec la souche épidémique NAP1/027 de *C. difficile* (Killgore *et al.*, 2008), qui ont acquis des caractéristiques infectieuses qui sont restées confinées à certains génotypes bien particuliers. Un constat similaire peut être fait avec le variant suédois du génotype E de *C. trachomatis* (Ripa & Nilsson, 2006; Seth-Smith *et al.*, 2009), alors qu'une délétion dans la séquence génétique ciblée par l'analyse diagnostique lui a permis de se soustraire à la détection clinique pendant quelques années (Unemo *et al.*, 2010). Par ailleurs, d'autres souches de *C. trachomatis* ont montré des associations très fortes avec des réseaux sexuels d'homme ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HARSAH) (Christerson *et al.*, 2012), ou encore, sont caractérisés par une hypervirulence comme la souche L(2)c issue de la recombinaison entre une souche de génotype D et une autre



souche de génotype L2 associée à la lymphogranulomatose vénérienne (Somboonna *et al.*, 2011).

Considérant ces différents exemples d'adaptations phénotypiques qui ont eu un impact significatif sur la dynamique infectieuse, nous avons été curieux de savoir si un génotype particulier de *C. trachomatis* pouvait être associé préférentiellement aux cas d'échec de traitement ou d'infection persistante. Le génotypage des spécimens cliniques a été fait en employant une méthode de typage moléculaire basée sur une analyse RFLP du gène ompA (Frost *et al.*, 1993). La prévalence moyenne de chacun des différents génotypes (D, E, F, G, H, I, J et K) a été établis dans un premier temps, puis ces résultats ont été comparés à ceux de 3 différentes études: une réalisée en Estrie en 1993 (Frost *et al.*, 1993) et deux autres réalisées en 2012 en Australie (Walker *et al.*, 2012) et en Norvège (Gravningen *et al.*, 2012). Outre quelques variations non significatives, nous avons observé que la prévalence du génotype J a presque doublé en Estrie, passant de 5% en 1993 à 12% en 2012, sans que cela n'ait plus être associée à une situation clinique particulière. Il apparait également que la prévalence du génotype D est restée relativement stable entre 1993 (18%) et 2012 (16%), bien que cela représente une prévalence beaucoup plus élevée que ce qui est observé en Australie (4%) et en Norvège (9%). Par rapport au niveau des cas d'échec de traitement et d'infection persistante, l'analyse des données de notre étude a permis d'établir un lien statistiquement significatif avec une infection par le génotype E et ces deux situations cliniques. En fait, il appert qu'il y a un risque accru qu'une infection évolue vers un échec de traitement ou une infection persistance, si elle est causée par le génotype E. Malgré cela, ce n'est pas parce qu'il y a une association statistique qu'il y a nécessairement un lien de causalité (Simpson *et al.*, 2009). En réalité, une association peut, ou non, être une relation de cause à effet, et un des principaux objectifs de l'épidémiologie est de décider si tel est le cas.

#### 4.2.3.1 Association et causalité

Une association est causale si une modification de l'exposition se traduit par une modification du résultat observé, soit de l'état de santé (ASPC, 2011). Plusieurs auteurs ont proposé des postulats, ou critères, afin d'évaluer si une association est bel et bien

causale. C'est entre autres ce qu'a fait le microbiologiste Robert Koch lorsqu'il énonça 4 postulats en 1882 permettant de reconnaître un agent pathogène (Hennekens *et al.*, 1998). Avec le temps les postulats de Koch furent jugés trop limitatifs pour une application étendue en santé publique, ce qui amena l'épidémiologiste Austin Bradford Hill en 1965, à proposer une série de critères pour évaluer la causalité d'une association (ASPC, 2011). Les critères initiaux de Hill ont par la suite été rediscutés et nuancés par un grand nombre d'auteurs en épidémiologie et aujourd'hui, ils forment un groupe de conditions minimales pour fournir une preuve adéquate d'une relation causale (ASPC, 2011).

#### 4.2.3.1.1 Force de l'association

Le premier critère de causalité est la force de l'association, soit que plus l'association entre un résultat et une exposition est forte, plus il est probable que cette association soit causale. Dans le cas de l'infection par le génotype E le test de Chi<sup>2</sup> montre que l'association avec les cas d'échec de traitement et d'infection persistante est hautement significative, ce qui n'est pas le cas avec les autres génotypes.

#### 4.2.3.1.2 Convergence

Si l'association est observée dans différentes populations et à différentes reprises ou dans d'autres études, dans des conditions différentes et fondées sur d'autres méthodes, la probabilité d'une relation de causalité est plus grande. Malheureusement, nous n'avons pas connaissance d'autres études qui auraient eu comme objectif d'établir s'il y aurait un lien entre un génotype et les cas les cas d'échec de traitement et d'infection persistante.

#### 4.2.3.1.3 Spécificité

Si un agent ou un facteur de risque est constamment et uniquement relié à la maladie étudiée, il devient vraisemblable qu'une relation causale existe. Or, dans notre étude, le génotype E est également présent dans les cas de réinfection qui ne sont pas des échecs de traitement ni des infections persistantes. Par contre, comme il sera discuté

plus loin, les 15 génotypes de *C. trachomatis* se déclinent en plusieurs sous-types différents. Ainsi, pour le génotype E, 4 sous-types différents ont été identifiés antérieurement. Il est possible que ce soit l'un de ces sous-types qui soit spécifiquement associé aux échecs de traitement et aux infections persistantes, alors que les autres sous-types ne présentent pas d'association particulière avec ces situations cliniques. L'évaluation du critère de spécificité nous dicte aussi de vérifier si les cas d'échec de traitement et d'infection persistante sont uniquement observés chez les patients infectés par le génotype E ou s'il y en a chez les patients infectés par d'autres génotypes. À cette question notre étude montre que tous les génotypes, hormis le K, ont pu être retrouvés dans au moins un cas d'échec de traitement et d'infection persistante. Malgré tout, le génotype E représente à lui seul près de 60% des cas, comparativement à environ 30% des cas de réinfection. Pour les autres génotypes, bien qu'ils soient présents dans les cas d'échec de traitement et d'infection persistante, ils le sont dans une proportion qui n'est pas statistiquement différente de ce qui est observé dans les cas de réinfection. Il s'agit probablement de cas de réinfection avec le même partenaire ou avec un autre partenaire infecté par le même génotype. De ce fait, nous pouvons croire avec une bonne certitude que la spécificité du génotype E pour les cas d'échec de traitement et d'infection persistante est bien réelle.

#### 4.2.3.1.4 Séquence temporelle

Ce critère de causalité, qui est particulièrement important dans le cas de maladies qui évoluent lentement, vise à vérifier si l'exposition à la cause présumée précède toujours l'apparition de la maladie. Ce critère ne s'applique toutefois pas à notre étude, puisque l'exposition à la bactérie *C. trachomatis*, peu importe le génotype, doit obligatoirement précéder l'apparition d'une infection, que cette dernière évolue ou non vers un échec de traitement ou une infection persistante. Ce critère ne peut donc pas s'appliquer ici et ne doit pas être considéré.

#### 4.2.3.1.5 Gradient biologique

Le critère du gradient biologique implique la présence d'une courbe dose-effet, où l'on cherche à savoir si la fréquence ou la gravité de l'effet augmente avec l'intensité de

l'exposition à la cause présumée. Ce critère, plutôt associé aux études pharmacologiques ou toxicologiques, se traduit davantage en infectiologie par un concept où on cherche à savoir si les personnes ayant connu l'exposition la plus forte ou la plus longue à l'agent pathogène, sont celles qui sont frappées le plus gravement ou le plus fréquemment par la maladie, alors que celles qui y ont été moins exposées ne sont pas aussi malades. De prime abord, notre étude n'a pas montré de corrélation avec la charge bactérienne comme cela a été discuté précédemment. Néanmoins, considérant la capacité naturelle de *C. trachomatis* à entrer dans un état de persistance lors d'une infection où l'environnement biologique lui devient hostile (Hammerschlag, 2002), on peut se demander si la dose infectieuse, telle qu'elle est présentée par le critère du gradient biologique, peut avoir un impact. Ici, il faudrait chercher à savoir si une plus grande charge bactérienne lors d'une infection par un génotype qui cause des échecs de traitement ou des infections persistantes accentue le phénomène ou non.

#### 4.2.3.1.6 Plausibilité biologique et cohérence

Si l'association peut être expliquée par un mécanisme pathogène connu, l'hypothèse devient biologiquement plausible. C'est le niveau des connaissances dans le domaine visé qui permettra de déterminer si ce critère est rempli ou non. De même, on parle de cohérence lorsqu'il n'y a pas d'incompatibilité flagrante entre le caractère causal que l'on attribue à une association et les connaissances que l'on possède sur l'histoire naturelle. En ce qui a trait à *C. trachomatis*, la capacité de persistance, de résistance passive et d'évasion de la réponse immunitaire est bien documentée (Mpiga & Ravaoarino, 2006). De plus, avec le nvCT, le génotype E de *C. trachomatis* a déjà montré une capacité d'adaptations phénotypiques et réponse à une pression de sélection (Seth-Smith *et al.*, 2009). Il est donc cohérent et biologiquement plausible de croire que certaines souches aient acquis une capacité accrue à persister et à résister aux traitements.

#### 4.2.3.1.7 Analogie

Finalement, l'évaluation de l'analogie, dans un contexte de maladie infectieuse, cherche à savoir si un phénomène semblable a déjà été observé chez un autre agent

pathogène. Or, en plus de la plausibilité biologique et de la cohérence associée à notre hypothèse sur l'émergence de souches de *C. trachomatis* plus aptes à adopter un état de persistance, cette dernière se base également sur l'observation chez d'autres espèces bactériennes de l'émergence de certaines caractéristiques infectieuses associées spécifiquement à un génotype particulier et qui ont modifié la dynamique infectieuse (SARM (Enright, 2003), BORSA (Zierdt *et al.*, 1992), pneumocoques hautement résistants à la pénicilline (Shi *et al.*, 1998) et *C. difficile* épidémique (NAP1/027) (Killgore *et al.*, 2008)).

### 4.3 Analyse et synthèse

Une des forces de notre étude est sans contredit le grand nombre de patients qu'elle comporte, ainsi que le nombre de spécimens cliniques qui ont été analysés. Cela se reflète d'abord dans la distribution des patients selon les différents groupes d'âge, qui est comparable à ce qui est retrouvé dans l'ensemble du Québec<sup>21</sup>. On peut également dresser un constat similaire au niveau de la prévalence moyenne des différents génotypes retrouvés dans les spécimens cliniques et dont les valeurs sont globalement comparables à celles de trois autres études du même type.

Maintenant, en ce qui a trait aux biais qui peuvent limiter la portée de cette étude, certains éléments ont permis d'en contrôler quelques un (Simpson *et al.*, 2009). D'abord, que ce soit directement à l'hôpital, dans une clinique médicale, dans un centre de planning familial ou dans un centre de santé, l'ensemble des spécimens cliniques de la région estrienne pour la détection de *C. trachomatis* sont envoyés au CHUS. Nous limitons donc grandement le biais de sélection qui aurait pu affecter cette étude. De plus, notre définition large, claire et précise des patients pouvant être inclus dans l'étude, c.-à-d. avoir eu deux épisodes ou plus de chlamydie génitale entre 2002 et 2012, a permis de saisir un maximum de cas possible. Qui plus est, ne sachant pas à l'avance qui des patients seraient les cas et les témoins, ces derniers ont eu les mêmes opportunités de rentrer dans l'étude. Nous avons également contrôlé le biais d'information en référent aux dossiers médicaux électroniques du CHUS, afin d'avoir

---

<sup>21</sup> Registre des maladies à déclaration obligatoire. LSPQ. extraction en date du 16 avril 2012

une source commune d'informations pour tous les patients de l'étude. Aussi, considérant que les cas et les témoins sont tous atteints de chlamydie génitale et que la distinction entre ces deux groupes se fait sur la base de critères cliniques, cela permet de contrôler le biais diagnostique inhérent au fait que la probabilité d'être détecté comme cas ou témoin puisse différer.

Ceci étant dit, bien qu'il n'ait pas été possible d'identifier de spécimen résistant à l'azithromycine, la méthode de détection moléculaire par TaqTm Probing représente un outil moléculaire de choix pour les laboratoires cliniques. L'expertise technique simple qu'elle nécessite et la facilité d'analyse des résultats qui sont obtenus la rendent d'autant plus accessible. En plus de la caractérisation de spécimens de *C. jejuni* et de *C. trachomatis* par la détection de SNP spécifiques, le TaqTm Probing a été appliqué avec succès au CHUS pour la détection de résistance à l'oseltamivir chez le virus de l'influenza A(H1N1) et des projets en cours visent à développer des méthodes pour détecter des résistances aux fluoroquinolones chez les entérobactéries et pour caractériser les souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline et d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine.

Couplée à un programme de surveillance épidémiologique prospectif de la chlamydie génitale, l'utilisation du TaqTm Probing permettrait aussi de monitorer l'émergence de résistance chez ce pathogène. À tout le moins, les futurs cas d'échec de traitement et d'infection persistante pourraient être soumis à une analyse de résistance à l'azithromycine. Dans le même ordre d'idée, la mise en place d'une technique de prélèvement standard des spécimens cliniques uro-génitaux permettrait prospectivement de mieux évaluer l'impact de la charge bactérienne sur l'issue de l'infection. Par contre, considérant la multitude de professionnels de la santé qui procède à ces prélèvements chaque année, il est peu probable que cela soit réalisable dans des limites méthodologiques acceptables. Toujours est-il que des études spécialement conçues pourraient être réalisées afin d'investiguer davantage cet aspect de l'infection.

Enfin, pour ce qui est de l'association entre le génotype E et les cas d'échec de traitement et d'infection persistante, l'évaluation du lien causal à l'aide des critères de Hills a permis de renforcer l'idée selon laquelle il existe un lien de cause à effet.

Par contre, il serait nécessaire de sous-typé les spécimens cliniques de génotype E, afin de raffiner notre compréhension du rôle potentiel que joue ce génotype dans le changement de dynamique infectieuse de la chlamydie génitale. Une approche employant le système MLST serait à envisager, car cette méthode permet de faire de l'épidémiologie moléculaire à long terme et donc d'avoir une meilleure vision de l'évolution génétique des populations de *C. trachomatis* (Gravningen *et al.*, 2012). Notre laboratoire a d'ailleurs développé une méthode de typage par MLST appliquée à cette bactérie, mais les coûts actuels liés aux séquençages des gènes analysés limitent grandement son utilisation dans une étude comme la nôtre. Une analyse des séquences par HRM au lieu du séquençage, comme cela a été fait pour le système MLST de *C. jejuni* (Levesque *et al.*, 2011), pourrait diminuer significativement les coûts associés et rendre cette méthode beaucoup plus abordable. Considérant l'implication potentielle du génotype E dans les cas d'échec de traitement et d'infection persistante, cela devient d'autant plus intéressant de développer d'avantage les aspects qui lient l'épidémiologie moléculaire de *C. trachomatis* et les phénotypes cliniques exprimés.

#### **4.4 Conclusions et perspectives**

Les données épidémiologiques et cliniques des 15 dernières années restent préoccupantes et il est de plus en plus évident qu'un changement s'opère dans la dynamique infectieuse de la chlamydie génitale. Dans ce contexte, cette étude nous a mieux renseignées sur le portrait clinique de la chlamydie génitale. Les résultats indiquent qu'il y a une cause bactérienne probable aux échecs de traitement et aux infections persistantes associées au génotype E, alors que les SNP de résistances et la charge bactérienne de l'infection ne semblent pas être en cause. Les prochaines étapes consisteront d'abord à sous-typé les spécimens de génotype E, pour lequel il existe 4 souches, afin de vérifier si l'une d'entre elles est spécifiquement associée aux cas d'échec de traitement et d'infection persistante. Si cela s'avère positif, il faudra alors passer à l'étape du séquençage et chercher à identifier des marqueurs moléculaires qui pourraient mieux nous renseigner sur sa capacité à faire échec au traitement et à persister.

En terminant, il faut aussi garder à l'esprit que le génotype E n'est peut-être pas un facteur de risque absolu pour les échecs de traitements et les infections persistantes. Peut-être que la présence d'un sous-type du génotype E est un élément parmi d'autres qui est nécessaire à une évolution vers un échec de traitement ou une infection persistante. Étant ainsi tributaire d'autres facteurs étiologiques, cette souche n'aura pas tendance à devenir dominante, comme ce fut le cas avec le nvCT en Suède, d'autant plus si ces facteurs lui sont indépendants. Cette hypothèse pourrait rendre plus fastidieuse l'identification d'une souche spécifiquement associée aux cas d'échec de traitement et d'infection persistante.

Malgré tout, toutes ces pistes de réflexion permettront de mieux orienter les recherches à venir, afin d'améliorer notre compréhension de l'épidémiologie globale de la chlamydiae génitale, mais aussi, afin d'offrir une rétroaction positive en santé publique et en prévention des ITS.



## REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord grandement remercier le Dr Eric Frost pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour que j'y poursuive mes études de 2e cycle et pour m'avoir donné l'opportunité d'étudier en microbiologie clinique. Merci pour vos enseignements, votre disponibilité et vos précieux conseils. Votre passion pour les applications de la biologie moléculaire pour le diagnostic de laboratoire aura été contagieuse!

Je remercie également Sylvie Deslandes et Simon Lévesque pour leurs conseils et l'aide technique dans la réalisation de mon projet, notamment en ce qui a trait à la PCR en temps réel, aux analyses HRM et à la préparation des spécimens de *C. jejuni*. Merci à Isabelle Ménard pour les informations sur l'épidémiologie de la chlamydie génitale et sur les analyses de spécimens cliniques de *C. trachomatis*.

Merci aux membres de mon jury d'évaluation, Dr Brendan Bell et Dr Claude Déry. Merci à Mathieu Durand du Centre de Rnomic de l'Université de Sherbrooke pour les analyses par électrophorèse capillaire. Un grand merci à Simon Forest pour la programmation des algorithmes informatiques.

Merci à Stéphanie Sirard, Evelyne Benoit, Laurie Vingataramin, Geneviève Giroux et Karine Bourgade, qui avant d'être des collègues de travail, sont d'abord des amies avec qui j'ai passé de très belles années au CHUS. Je garderai de très beaux souvenirs de cette super équipe que nous avons formés. Je tiens aussi à remercier Julie Gingras, Andrée Hinse-Grondin, Lily Marcoux et Janine Philie, technologistes médicales au CHUS, pour leurs supports à mon projet, ainsi qu'à toutes les personnes du département de microbiologie-infectiologie qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement ma maîtrise.

Merci à ma famille pour votre support et vos encouragements. Finalement, un merci très spécial à Marie-Ève, pour ton amour, pour m'avoir appuyé dans mes choix, pour avoir cru en moi et pour m'avoir encouragé durant ces 3 années d'étude!

## RÉFÉRENCES

**Altekruse S. F., Stern N. J., Fields P. I., Swerdlow D. L. (1999).** Campylobacter jejuni: an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**, 28-35.

**Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

**Appelbaum P. C. & Hunter P. A. (2000).** The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* **16**, 5-15.

**Agence de la santé publique du Canada (ASPC). (2011).** Concepts épidémiologiques de base, Programme d'amélioration des compétences en santé publique. Ottawa: Gouvernement du Canada.

**Agence de la santé publique du Canada (ASPC). (2010).** Rapport sur les infections transmissibles sexuellement au Canada: 2008, Centre de la lutte contre les maladies transmissibles et les infections. Ottawa: Gouvernement du Canada.

**Agence de la santé publique du Canada (ASPC). (2009).** Bref rapport sur les infections transmissibles sexuellement au Canada: 2007, Centre de la lutte contre les maladies transmissibles et les infections. Ottawa: Gouvernement du Canada.

**Agence de la santé publique du Canada (ASPC). (2008).** Lignes directrices canadiennes sur les infections transmissibles sexuellement, Centre de la lutte contre les maladies transmissibles et les infections. Ottawa: Gouvernement du Canada.

**Agence de santé et des services sociaux de Montréal (ASSS). (2006).** Bulletin sur les maladies à déclaration obligatoire. **15**.

**Ba B. B., Arpin C., Vidailiac C., Chausse A., Saux M. C., Quentin C. (2006).** Activity of gatifloxacin in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model against staphylococcus aureus strains either susceptible to ciprofloxacin or exhibiting various levels and mechanisms of ciprofloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1931-1936.

**Bassetti M., Dembry L. M., Farrel P. A., Callan D. A., Andriole V. T. (2001).** Comparative antimicrobial activity of gatifloxacin with ciprofloxacin and beta-lactams against gram-positive bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**, 143-148.

**Bastidas R. J., Elwell C. A., Engel J. N., Valdivia R. H. (2013).** Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a010256.

**Beatty W. L., Morrison R. P., Byrne G. I. (1995).** Reactivation of persistent chlamydia trachomatis infection in cell culture. *Infect Immun* **63**, 199-205.

**Bebear C. & de Barbeyrac B. (2009).** Genital chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect* **15**, 4-10.

**Bhengraj A. R., Vardhan H., Srivastava P., Salhan S., Mittal A. (2010).** Decreased susceptibility to azithromycin and doxycycline in clinical isolates of chlamydia trachomatis obtained from recurrently infected female patients in india. *Chemotherapy* **56**, 371-377.

**Binet R. & Maurelli A. T. (2005).** Frequency of spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in chlamydia spp. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2865-2873.

**Borges V., Ferreira R., Nunes A., Sousa-Uva M., Abreu M., Borrego M. J., Gomes J. P. (2013).** Effect of long-term laboratory propagation on chlamydia trachomatis genome dynamics. *Infect Genet Evol* **17**, 23-32.

**Burton M. J. (2007).** Trachoma: An overview. *Br Med Bull* **84**, 99-116.

**Byrne G. I. & Ojcius D. M. (2004).** Chlamydia and apoptosis: Life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **2**, 802-808.

**Caldwell H. D., Kromhout J., Schachter J. (1981).** Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of chlamydia trachomatis. *Infect Immun* **31**, 1161-1176.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011).** Sexually Transmitted Disease Surveillance, Department of Health and Human Services. Atlanta (Georgie): U.S. Government.

**Cevenini R., Donati M., Sambri V. (2002).** Chlamydia trachomatis - the agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **16**, 761-773.

**Christerson L., Bom R. J., Bruisten S. M., Yass R., Hardick J., Bratt G., Gaydos C. A., Morre S. A., Herrmann B. (2012).** Chlamydia trachomatis strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in sweden, the netherlands, and the united states. *J Clin Microbiol* **50**, 3548-3555.

**de Almeida M. V., Saraiva M. F., de Souza M. V., da Costa C. F., Vicente F. R., Lourenco M. C. (2007).** Synthesis and antitubercular activity of lipophilic moxifloxacin and gatifloxacin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 5661-5664.

**de Barbeyrac B., Papaxanthos-Roche A., Mathieu C., Germain C., Brun J. L., Gachet M., Mayer G., Bebear C., Chene G., Hocke C. (2006).** Chlamydia trachomatis in subfertile couples undergoing an in vitro fertilization program: A prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **129**, 46-53.

**Debattista J., Timms P., Allan J., Allan J. (2003).** Immunopathogenesis of chlamydia trachomatis infections in women. *Fertil Steril* **79**, 1273-1287.

**den Hartog J. E., Morre S. A., Land J. A. (2006).** Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update* **12**, 719-730.

**Didenko V. V. (2001).** DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Designs and applications. *BioTechniques* **31**, 1106-16, 1118, 1120-1.

**Drlica K. (1999).** Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* **2**, 504-508.

**Enright M. C. (2003).** The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 474-479.

**Everett K. D., Bush R. M., Andersen A. A. (1999).** Emended description of the order chlamydiales, proposal of parachlamydiaceae fam. nov. and simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 415-440.

**Fang J. W., Chow V., Lau J. Y. (1997).** Virology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* **1**, 493-514, v.

**Feil E. J. & Enright M. C. (2004).** Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **7**, 308-313.

**Foxman B. & Riley L. (2001).** Molecular epidemiology: Focus on infection. *Am J Epidemiol* **153**, 1135-1141.

**Frost E. H., Deslandes S., Bourgaux-Ramoisy D. (1993).** Chlamydia trachomatis serovars in 435 urogenital specimens typed by restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Infect Dis* **168**, 497-501.

**Frost E. H., Deslandes S., Veilleux S., Bourgaux-Ramoisy D. (1991).** Typing chlamydia trachomatis by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. *J Infect Dis* **163**, 1103-1107.

**Frost E. H., Deslandes S., Gendron D., Bourgaux-Ramoisy D., Bourgaux P. (1995).** Variation outside variable segments of the major outer membrane protein distinguishes trachoma from urogenital isolates of the same serovar of chlamydia trachomatis. *Genitourin Med* **71**, 18-23.

**Geisler W. M. (2010).** Duration of untreated, uncomplicated chlamydia trachomatis genital infection and factors associated with chlamydia resolution: A review of human studies. *J Infect Dis* **201 Suppl 2**, S104-13.

**Gerard H. C., Whittum-Hudson J. A., Schumacher H. R., Hudson A. P. (2006).** Synovial chlamydia trachomatis up regulates expression of a panel of genes similar to that transcribed by mycobacterium tuberculosis during persistent infection. *Ann Rheum Dis* **65**, 321-327.

**Gerard H. C., Freise J., Wang Z., Roberts G., Rudy D., Krauss-Opatz B., Kohler L., Zeidler H., Schumacher H. R., Whittum-Hudson J. A., Hudson A. P. (2002).** Chlamydia trachomatis genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection. *Microbes Infect* **4**, 13-22.

**Golden M. R., Whittington W. L., Handsfield H. H., Hughes J. P., Stamm W. E., Hogben M., Clark A., Malinski C., Helmers J. R., Thomas K. K., Holmes K. K. (2005).** Effect of expedited treatment of sex partners on recurrent or persistent gonorrhea or chlamydial infection. *N Engl J Med* **352**, 676-685.

**Gravningen K., Christerson L., Furberg A. S., Simonsen G. S., Odman K., Stahlsten A., Herrmann B. (2012).** Multilocus sequence typing of genital chlamydia trachomatis in Norway reveals multiple new sequence types and a large genetic diversity. *PLoS One* **7**, e34452.

**Guerrant R. L., Van Gilder T., Steiner T. S., Thielman N. M., Slutsker L., Tauxe R. V., Hennessy T., Griffin P. M., DuPont H. & other authors. (2001).** Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* **32**, 331-351.

**Hammerschlag M. R. (2011).** Chlamydial and gonococcal infections in infants and children. *Clin Infect Dis* **53 Suppl 3**, S99-102.

**Hammerschlag M. R. (2002).** The intracellular life of chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis* **13**, 239-248.

**Harkinezhad T., Geens T., Vanrompay D. (2009).** Chlamydophila psittaci infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet Microbiol* **135**, 68-77.

**Harper A., Pogson C. I., Jones M. L., Pearce J. H. (2000).** Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infect Immun* **68**, 1457-1464.

**Heinzen R. A., Scidmore M. A., Rockey D. D., Hackstadt T. (1996).** Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of coxiella burnetii and chlamydia trachomatis. *Infect Immun* **64**, 796-809.

**Hendriksen R. S., Price L. B., Schupp J. M., Gillece J. D., Kaas R. S., Engelthaler D. M., Bortolaia V., Pearson T., Waters A. E. & other authors. (2011).** Population genetics of vibrio cholerae from Nepal in 2010: Evidence on the origin of the Haitian outbreak. *MBio* **2**, e00157-11.

**Hennekens C. H., Buring J. E., Mayrent S. L. (1998).** Épidémiologie en médecine, Édition Frison-Roche, Paris.

**Herrmann B. (2007).** A new genetic variant of chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* **83**, 253-254.

**Herrmann B., Torner A., Low N., Klint M., Nilsson A., Velicko I., Soderblom T., Blaxhult A. (2008).** Emergence and spread of chlamydia trachomatis variant, sweden. *Emerg Infect Dis* **14**, 1462-1465.

**Hocking J. S., Vodstrcil L., Huston W. M., Timms P., Chen M., Worthington K., McIver R., Tabrizi S. N. (2013).** A cohort study of chlamydia trachomatis treatment failure in women: A study protocol. *BMC Infect Dis* **13**, 379.

**Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. (1991).** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**.

**Horner P. (2006).** The case for further treatment studies of uncomplicated genital chlamydia trachomatis infection. *Sex Transm Infect* **82**, 340-343.

**Hu Y. & Coates A. (2012).** Nonmultiplying bacteria are profoundly tolerant to antibiotics. *Handb Exp Pharmacol* (211):99-119. doi, 99-119.

**Ince D. & Hooper D. C. (2001).** Mechanisms and frequency of resistance to gatifloxacin in comparison to AM-1121 and ciprofloxacin in staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2755-2764.

**Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). (2012).** Rapport intégré: épidémiologie des infections transmissibles sexuellement et par le sang au Québec, Direction des risques biologiques et de la santé au travail. Québec: Gouvernement du Québec.

**Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). (2011).** Concepts de base en épidémiologie de terrain, Programme d'investigation d'éclosion dans la communauté et dans les milieux de soins. Québec: Gouvernement du Québec.

**Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). (2009).** Analyse des cas déclarés d'infection génitale à *Chlamydia trachomatis*, d'infection gonococcique et de syphilis au Québec par année civile: 1993-2008 (et projections 2009), Direction des risques biologiques et de la santé au travail. Québec: Gouvernement du Québec.

**Iovine N. M. (2013).** Resistance mechanisms in campylobacter jejuni. *Virulence* **4**, 230-240.

**Jones R. B., Van der Pol B., Martin D. H., Shepard M. K. (1990).** Partial characterization of chlamydia trachomatis isolates resistant to multiple antibiotics. *J Infect Dis* **162**, 1309-1315.

**Kersh G. J., Fitzpatrick K. A., Self J. S., Priestley R. A., Kelly A. J., Lash R. R., Marsden-Haug N., Nett R. J., Bjork A., Massung R. F., Anderson A. D. (2013).** Presence and persistence of coxiella burnetii in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Appl Environ Microbiol* **79**, 1697-1703.

**Killgore G., Thompson A., Johnson S., Brazier J., Kuijper E., Pepin J., Frost E. H., Savelkoul P., Nicholson B. & other authors. (2008).** Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *clostridium difficile*: REA, PFGE, PCR-ribotyping, MLST, MLVA, AFLP, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* **46**, 431-437.

**Lampe M. F., Wong K. G., Stamm W. E. (1995).** Sequence conservation in the major outer membrane protein gene among *chlamydia trachomatis* strains isolated from the upper and lower urogenital tract. *J Infect Dis* **172**, 589-592.

**Lan J., Ossewaarde J. M., Walboomers J. M., Meijer C. J., van den Brule A. J. (1994).** Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. *J Clin Microbiol* **32**, 528-530.

**Last J. M., Maxcy K. F., Rosenau M. J., Wallace R. B. (1998).** Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine, 14e édition illustrée, R. B. Wallace: Appleton & Lange.

**Leonhardt R. M., Lee S. J., Kavathas P. B., Cresswell P. (2007).** Severe tryptophan starvation blocks onset of conventional persistence and reduces reactivation of *chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* **75**, 5105-5117.

**Levesque S., Frost E., Michaud S. (2007).** Comparison of antimicrobial resistance of *campylobacter jejuni* isolated from humans, chickens, raw milk, and environmental water in quebec. *J Food Prot* **70**, 729-735.

**Levesque S., Michaud S., Arbeit R. D., Frost E. H. (2011).** High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *campylobacter jejuni*. *PLoS One* **6**, e16167.

**Levesque S., Frost E., Arbeit R. D., Michaud S. (2008).** Multilocus sequence typing of *campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in quebec, canada. *J Clin Microbiol* **46**, 3404-3411.

**Levesque S., St-Pierre K., Frost E., Arbeit R. D., Michaud S. (2011).** Determination of the optimal culture conditions for detecting thermophilic *campylobacters* in environmental water. *J Microbiol Methods* **86**, 82-88.

**Ljubin-Sternak S., Mestrovic T., Vilibic-Cavlek T., Mlinaric-Galinovic G., Sviben M., Markotic A., Skerk V. (2013).** In vitro susceptibility of urogenital *chlamydia trachomatis* strains in a country with high azithromycin consumption rate. *Folia Microbiol (Praha)* **58**, 361-365.

**Luebke R. W., Parks C., Luster M. I. (2004).** Suppression of immune function and susceptibility to infections in humans: Association of immune function with clinical disease. *Journal of Immunotoxicology* , 15.

**M. Exner M. (2012).** Multiplex molecular reactions: Design and troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter* **34**, 60.

**MacCannell D. (2013).** Bacterial strain typing. *Clin Lab Med* **33**, 629-650.

**Magbanua J. P., Goh B. T., Michel C. E., Aguirre-Andreasen A., Alexander S., Ushiro-Lumb I., Ison C., Lee H. (2007).** Chlamydia trachomatis variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: Molecular characterisation and failure of single dose azithromycin. *Sex Transm Infect* **83**, 339-343.

**Michaud S., Menard S., Arbeit R. D. (2004).** Campylobacteriosis, eastern townships, quebec. *Emerg Infect Dis* **10**, 1844-1847.

**Millman K. L., Tavare S., Dean D. (2001).** Recombination in the ompA gene but not the omcB gene of chlamydia contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism. *J Bacteriol* **183**, 5997-6008.

**Misyurina O. Y., Shipitsina E. V., Parfenova T. M., Lazarev V. N., Savicheva A. M., Govorun V. M. (2002).** Evaluation of antibiotic sensitivity of chlamydia trachomatis using RT-PCR. *Bull Exp Biol Med* **133**, 308-310.

**Misyurina O. Y., Chipitsyna E. V., Finashutina Y. P., Lazarev V. N., Akopian T. A., Savicheva A. M., Govorun V. M. (2004).** Mutations in a 23S rRNA gene of chlamydia trachomatis associated with resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1347-1349.

**Mpiga P. & Ravaoarinoro M. (2006).** Chlamydia trachomatis persistence: An update. *Microbiol Res* **161**, 9-19.

**Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). (2013).** Portrait des infections transmissibles sexuellement et par le sang (ITSS) au Québec: Année 2011 (et projections 2012), Direction des communications du MSSS: Gouvernement du Québec..

**Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). (2011).** Portrait des infections transmissibles sexuellement et par le sang (ITSS) au Québec: Année 2010 (et projections 2011), Direction des communications du MSSS: Gouvernement du Québec.

**Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). (2003).** Prévenir et enrayer les infections transmissibles sexuellement: Situations et orientations, Direction des communications du MSSS: Gouvernement du Québec.

**Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS). (2002).** Analyse des cas d'infection génitale à Chlamydia trachomatis, de gonorrhée, d'hépatite B et de syphilis déclarés au Québec par année civile 1996 à 2000, Analyse et surveillance, La Direction des communications du MSSS: Gouvernement du Québec.



**Noto M. J., Fox P. M., Archer G. L. (2008).** Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, *mecA*, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1221-1229.

**Nunes A., Borrego M. J., Nunes B., Florindo C., Gomes J. P. (2009).** Evolutionary dynamics of *ompA*, the gene encoding the chlamydia trachomatis key antigen. *J Bacteriol* **191**, 7182-7192.

**Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K., Saika T., Hoshina S., Iwasaku K., Nakayama S., Kitawaki J., Unemo M. (2011).** Is neisseria gonorrhoeae initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3538-3545.

**Oliver J. D. (2005).** The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* **43 Spec No**, 93-100.

**Otis, J. (1996).** Santé sexuelle et prévention des MTS et de l'infection au VIH. Bilan d'une décennie de recherche au Québec auprès des adolescents et adolescentes et des jeunes adultes, Ministère de la Santé et des Services sociaux, (Collection études et analyses, no **28**).

**Paavonen J. (2012).** Chlamydia trachomatis infections of the female genital tract: State of the art. *Ann Med* **44**, 18-28.

**Paavonen J., Karunakaran K. P., Noguchi Y., Anttila T., Bloigu A., Dillner J., Hallmans G., Hakulinen T., Jellum E. & other authors. (2003).** Serum antibody response to the heat shock protein 60 of chlamydia trachomatis in women with developing cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* **189**, 1287-1292.

**Parent R. & Alary M. (2000).** L'évolution de la chlamydirose et l'implantation des techniques d'amplification génique pour son dépistage dans les laboratoires médicaux du Québec, L'évolution de la chlamydirose et l'implantation des techniques d'amplification génique pour son dépistage dans les laboratoires médicaux du Québec. Québec: Gouvernement du Québec.

**Parent R. & Alary M. (1999).** Analyse des cas de chlamydirose, de gonorrhée, d'infection par le virus de l'hépatite B et de syphilis déclarés au Québec par année civile 1994-1998, Centre de coordination sur le SIDA, ministère de la Santé et des Services sociaux. Québec: Gouvernement du Québec.

**Pepin J., Plummer F. A., Brunham R. C., Piot P., Cameron D. W., Ronald A. R. (1989).** The interaction of HIV infection and other sexually transmitted diseases: An opportunity for intervention. *AIDS* **3**, 3-9.

**Perichon B., Courvalin P., Galimand M. (2007).** Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2464-2469.

**Piatkowska E., Piatkowski J., Przondo-Mordarska A. (2012).** The strongest resistance of staphylococcus aureus to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cell Mol Biol Lett* **17**, 633-645.

**Pickett M. A., Everson J. S., Pead P. J., Clarke I. N. (2005).** The plasmids of chlamydia trachomatis and chlamydophila pneumoniae (N16): Accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology* **151**, 893-903.

**Poitras E. & Houde A. (2012).** La PCR en temps réel: Principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**.

**Quentin R. & Verdon R. (2012).** Microbiologic basis of diagnosis and treatment of pelvic inflammatory disease. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **41**, 850-863.

**Reinert R. R. (2009).** The antimicrobial resistance profile of streptococcus pneumoniae. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 3**, 7-11.

**Ripa T. & Nilsson P. A. (2007).** A chlamydia trachomatis strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis* **34**, 255-256.

**Ripa T. & Nilsson P. (2006).** A variant of chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: Implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* **11**, E061109.2.

**Riska P. F., Kutlin A., Ajiboye P., Cua A., Roblin P. M., Hammerschlag M. R. (2004).** Genetic and culture-based approaches for detecting macrolide resistance in chlamydia pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3586-3590.

**Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G. A., Macielag M., Abbanat D., Park C. H., Bush K., Hooper D. C. (2006).** Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**, 83-88.

**Rutala W. A. & Weber D. J. (2001).** New disinfection and sterilization methods. *Emerg Infect Dis* **7**, 348-353.

**Seth-Smith H. M., Harris S. R., Persson K., Marsh P., Barron A., Bignell A., Bjartling C., Clark L., Cutcliffe L. T. & other authors. (2009).** Co-evolution of genomes and plasmids within chlamydia trachomatis and the emergence in sweden of a new variant strain. *BMC Genomics* **10**, 239-2164-10-239.

**Shi Z. Y., Enright M. C., Wilkinson P., Griffiths D., Spratt B. G. (1998).** Identification of three major clones of multiply antibiotic-resistant streptococcus pneumoniae in taiwanese hospitals by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **36**, 3514-3519.

**Simpson A., Beaucage C., Bonnier-Viger Y. (2009).** Épidémiologie appliquée: Une initiation à la lecture critique de la littérature en sciences de la santé, 2<sup>e</sup> édition, Gaëtan Morin. Québec: Chenelière Éducation.

**Solomon A. W., Mohammed Z., Massae P. A., Shao J. F., Foster A., Mabey D. C., Peeling R. W. (2005).** Impact of mass distribution of azithromycin on the antibiotic susceptibilities of ocular chlamydia trachomatis. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4804-4806.

**Somani J., Bhullar V. B., Workowski K. A., Farshy C. E., Black C. M. (2000).** Multiple drug-resistant chlamydia trachomatis associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis* **181**, 1421-1427.

**Somboonna N., Wan R., Ojcius D. M., Pettengill M. A., Joseph S. J., Chang A., Hsu R., Read T. D., Dean D. (2011).** Hypervirulent chlamydia trachomatis clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L(2)) and D lineages. *MBio* **2**, e00045-11.

**Stephens R. S. & Lammel C. J. (2001).** Chlamydia outer membrane protein discovery using genomics. *Curr Opin Microbiol* **4**, 16-20.

**Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. (2005).** Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein qnr with escherichia coli DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 118-125.

**Tyagi S. & Kramer F. R. (1996).** Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* **14**, 303-308.

**Unemo M. & Clarke I. N. (2011).** The swedish new variant of chlamydia trachomatis. *Curr Opin Infect Dis* **24**, 62-69.

**Unemo M., Seth-Smith H. M., Cutcliffe L. T., Skilton R. J., Barlow D., Goulding D., Persson K., Harris S. R., Kelly A. & other authors. (2010).** The swedish new variant of chlamydia trachomatis: Genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology* **156**, 1394-1404.

**Urwin R. & Maiden M. C. (2003).** Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**, 479-487.

**Vacher S., Menard A., Bernard E., Santos A., Megraud F. (2005).** Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic campylobacter spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist* **11**, 40-47.

**van Hoek A. H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J. (2011).** Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front Microbiol* **2**, 203.

**Vickers D. M., Zhang Q., Osgood N. D. (2009).** Immunobiological outcomes of repeated chlamydial infection from two models of within-host population dynamics. *PLoS One* **4**, e6886.

**Walker J., Tabrizi S. N., Fairley C. K., Chen M. Y., Bradshaw C. S., Twin J., Taylor N., Donovan B., Kaldor J. M. & other authors. (2012).** Chlamydia trachomatis incidence and re-infection among young women--behavioural and microbiological characteristics. *PLoS One* **7**, e37778.

**Wang S. & Grayston J. T. (1975).** Chlamydia trachomatis immunotype J. *J Immunol* **115**, 1711-1716.

**Wang S. A., Papp J. R., Stamm W. E., Peeling R. W., Martin D. H., Holmes K. K. (2005).** Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for chlamydia trachomatis: A meeting report. *J Infect Dis* **191**, 917-923.

**Wang S. P., Kuo C. C., Barnes R. C., Stephens R. S., Grayston J. T. (1985).** Immunotyping of chlamydia trachomatis with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* **152**, 791-800.

**Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S. (1999).** Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* **17**, 804-807.

**White J. A. (2009).** Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis* **22**, 57-66.

**Wyrick P. B. (2010).** Chlamydia trachomatis persistence in vitro: An overview. *J Infect Dis* **201 Suppl 2**, S88-95.

**Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y. (2007).** New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an escherichia coli clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3354-3360.

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

**Zhu H., Wang H. P., Jiang Y., Hou S. P., Liu Y. J., Liu Q. Z. (2010).** Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in chlamydia trachomatis strains selected in vitro by macrolide passage. *Andrologia* **42**, 274-280.

**Zierdt C. H., Hosein I. K., Shively R., MacLowry J. D. (1992).** Phage pattern-specific oxacillin-resistant and borderline oxacillin-resistant staphylococcus aureus in U.S. hospitals: Epidemiological significance. *J Clin Microbiol* **30**, 252-254.

**Zilbauer M., Dorrell N., Wren B. W., Bajaj-Elliott M. (2008).** Campylobacter jejuni-mediated disease pathogenesis: An update. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 123-129.