

Typage et étude de la sensibilité des souches de *Chlamydia trachomatis* isolées en France, 1999-2001

Bertille de Barbeyrac¹, Maïthé Clerc¹, Yamina Idrissi¹, Christiane Bébéar¹,
Cédric Scribans¹, Véronique Goulet²

¹ Centre national de référence des chlamydia, Université de Bordeaux 2

² Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice

INTRODUCTION

Dans le but de caractériser par génotypage les souches de *C. trachomatis* identifiées au cours des infections urogénitales en France et d'étudier leur sensibilité aux antibiotiques, une étude a été réalisée par le Centre national de référence (CNR) des *chlamydiae* pour évaluer la faisabilité d'une telle approche à partir d'échantillons biologiques congelés.

C. trachomatis est une bactérie intracellulaire de culture difficile qui comprend 18 sérovars. Les tableaux cliniques observés chez l'homme sont différents selon le sérovar : 10 donnent des infections urogénitales (sérovars D – K), 4 la lymphogranulomatose vénérienne (LGV) (sérovars L1-L3) et 4 le trachome (sérovars A – C). La détermination du sérovar nécessite l'isolement de la souche en culture cellulaire et l'utilisation d'anticorps monoclonaux non commercialisés. Depuis que les techniques de diagnostic par PCR ont été diffusées, la culture a été abandonnée par la plupart des laboratoires. Aussi des techniques moléculaires d'analyse du génovar ont été récemment développées permettant de typer directement les souches à partir d'échantillons biologiques. Les données sur les sérovars circulants en France sont très parcellaires et aucune étude n'a encore été entreprise à un niveau national.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nécessite, d'une part, l'isolement de la souche et, d'autre part, la compétence de laboratoires spécialisés. Du fait de l'abandon de la culture cellulaire comme méthode de diagnostic, un des objectifs du CNR est de recueillir des échantillons positifs pour isoler les souches. De nouveaux schémas thérapeutiques étant proposés et quelques échecs thérapeutiques ayant été décrits, le rôle du CNR est de vérifier la bonne activité des anciennes et des nouvelles molécules.

TYPAGE

Méthode

Il s'agit d'une étude rétrospective sur des échantillons urogénitaux identifiés positifs à *C. trachomatis* par le réseau de laboratoires Rénachla ainsi que sur des échantillons en provenance de la Guadeloupe. La collecte des échantillons de la période 1999-2001 était basée sur le volontariat. Sur la centaine de laboratoires contactés, seulement 20* ont pu envoyer par transporteur en carboglace leurs échantillons conservés congelés et 606 échantillons ont pu être ainsi examinés.

Le sérovar se définit d'après la réactivité d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de la protéine majeure de membrane externe ou MOMP (Major Outer Membrane Protein). Le génovar, déterminé par la séquence du gène de cette MOMP (*omp1*), analysée par une méthode de PCR-RFLP mise au point au laboratoire, correspond au sérovar [1]. L'analyse des communautés antigéniques de la MOMP permet de regrouper les souches en trois complexes regroupant différents sérovars : le complexe B (B, Ba, D, E, L1, L2, L2a), le complexe C (A, C, H, I, Ia, J, K et L3) et le complexe intermédiaire (F et G). Tous les échantillons ont été remis en culture. L'étude du génovar a été faite soit directement à partir des échantillons soit sur la souche isolée par culture cellulaire.

Résultats

Sur les 606 échantillons analysés, 376 ont été caractérisés par la méthode PCR-RFLP et 3 ont nécessité un séquençage du gène entier (tableau 1). Les souches caractérisées provenaient de 18 laboratoires dont 8 hospitaliers de 10 régions de France métropolitaine (n = 312) et de l'Institut Pasteur de Guadeloupe (n = 67). Tous les génovars urogénitaux connus sont représentés

en France. La majorité des souches appartient au complexe B, avec une prédominance du génovar E (France métropolitaine : 40,7 %, Guadeloupe : 34, 3 %). Il est à noter la présence de 3 souches appartenant à des génovars habituellement isolés dans le trachome, génovar B, ou la LGV, génovars L1 et L2.

Tableau 1

Distribution des génovars et complexes de *C. trachomatis* en France métropolitaine et en Guadeloupe

Génovar	Nombre (%) en		
	France métropolitaine	Guadeloupe	Total
Complexe B	179 (57,4)	36 (53,7)	214 (56,4)
D	35 (11,2)	4 (5,9)	39 (10,2)
Da	14 (4,5)	9 (13,4)	23 (6)
E	127 (40,7)	23 (34,3)	150 (39,5)
Autres (B, L1, L2)	3 (1)	0	3 (0,8)
Complexe F, G	79 (25,3)	18 (26,8)	97 (25,6)
F	42 (13,5)	16 (23,8)	58 (15,3)
G	37 (11,8)	2 (3)	39 (10,2)
Complexe C	50 (16)	13 (19,4)	63 (16,6)
H	16 (5,1)	0	16 (4,2)
I	11 (3,5)	6 (8,9)	17 (4,5)
Ia	1 (0,3)	5 (7,4)	6 (1,6)
J	6 (2,6)	2 (3)	8 (2,1)
K	16 (5,1)	0	16 (4,2)
Mixte E + (F, J ou I)	4 (1,3)	0	4 (1)
Total	312	67	379

Sur les 379 échantillons typés, seules les caractéristiques de 258 patients ont pu être analysées (tableau 2). Aucune association significative n'a été trouvée entre la présence de tels ou tels génovars regroupés en complexe et, le sexe, la présence ou non de signes cliniques, l'âge, la présence ou non d'autres microorganismes et la nature de ce dernier.

Tableau 2

Caractéristiques de 254 patients en fonction des données du génotypage (infections mixtes exclues)

Variables	Nombre (%) de souches du			
	Complexe B	Complexe F, G	Complexe C	Total
Total	146 (57,4)	69 (27,1)	39 (15,3)	254
Sexe Femme	112 (59,2)	49 (25,9)	28 (14,8)	189
Homme	34 (52,3)	20 (30,7)	11 (16,9)	65
Âge ≤ 20 ans	25 (44,6)	22 (39,3)	9 (16,1)	56
]20 – 25]	45 (66,1)	12 (17,6)	11 (16,1)	68
> 25 ans	76 (58,4)	35 (26,9)	19 (14,6)	130
Signes cliniques				
présence	108 (54,5)	60 (30,3)	30 (15,1)	198
absence	12 (57,1)	6 (28,6)	3 (14,3)	21
non renseigné	26 (74,3)	3 (8,6)	6 (17,1)	35

ÉTUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Méthodes

Du fait de la complexité de la technique, cette étude n'a pu être réalisée que sur un petit nombre de souches. Les souches ont été sélectionnées afin d'avoir un panel diversifié. Sur un total de 204 souches cultivées sur cellules McCoy à partir des échantillons congelés, 22 souches ont été sélectionnées sur leur origine géographique (Angers : 6, Paris Saint-Louis : 11, Bordeaux : 4, Toulouse : 1), leur géovar (géovar E : 11, géovar F : 3, géovar G : 4, géovar D : 3, géovar Da : 1) et l'association à des douleurs pelviennes. L'activité de trois antibiotiques, l'azithromycine, la doxycycline et l'ofloxacine a été étudiée par la méthode des dilutions en plaques 24 puits. L'activité des antibiotiques est évaluée par la détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice) définie comme la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber la formation d'une inclusion de *chlamydia* dans la cellule.

Résultats

Pour la totalité des souches, les CMI de l'azithromycine, la doxycycline et l'ofloxacine sont respectivement de 0,25 mg/L, 0,125 mg/L et 2 mg/L permettant de classer ces bactéries dans la catégorie sensible.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Typage

Il s'agit de la première étude de géotypage à l'échelle nationale sur des échantillons d'origine clinique conservés congelés. Sur les 606 échantillons reçus, 376 (63 %) ont pu être amplifiés. L'explication la plus probable de cette absence d'amplification est une dégradation de l'ADN lors de la conservation des échantillons. La technique de PCR-RFLP a permis de géotyper 99 % des échantillons amplifiés, d'identifier des infections mixtes et des infections à géovars rares. Elle apparaît donc adaptée aux études épidémiologiques. Bien que non représentative des souches isolées au niveau national, l'origine des souches est variée puisqu'elles proviennent de patients d'origines géographiques diverses et consultant des médecins du secteur public et libéral. L'analyse de la distribution des géovars montre une prédominance des géovars E et F comme cela est décrit dans la plupart des études qu'elles soient européennes, américaines ou japonaises. Le séquençage du gène *omp1* devrait permettre d'analyser plus finement les variations possibles au sein d'un même géovar et d'étudier la circulation des souches comme l'a montré récemment une étude canadienne [2]. L'analyse des liens statistiques entre un géovar et les données cliniques et bactériologiques n'a pu être faite que sur 68 % des patients en raison de la difficulté à relier les échantillons biologiques et les données Rénachla qui sont anonymes. Cette analyse n'a pas mis en évidence d'association significative entre géovar et signes cliniques comme dans la plupart des études publiées. La seule association décrite actuellement est celle montrant la persistance de l'infection et les géovars du complexe C [3].

Une retombée importante et récente de cette étude, a été la mise en évidence d'une épidémie de LGV identifiée en France, début 2004. Les points d'appel avaient été le signalement par les hollandais d'une épidémie récente chez des homosexuels de Rotterdam et l'augmentation en 2003 du nombre d'échantillons rectaux positifs à *C. trachomatis* signalés par le réseau Rénachla. Seul le typage des souches directement dans l'échantillon rectal permet de confirmer le diagnostic de LGV. La faisabilité du géotypage sur des prélèvements envoyés en caroblage ayant été démontrée par cette étude, il a été facile de mettre en place le dispositif de recueil des échantillons et de procéder au géotypage des souches anorectales transmises par plusieurs laboratoires parisiens. Les prélèvements avaient été réalisés chez des hommes homosexuels qui avaient des signes cliniques d'ano-rectite. Presque toutes les souches étaient de géovar L2, ce qui a permis de confirmer

l'émergence d'une épidémie de LGV en France et de prendre des mesures. Le géotypage pratiqué sur toutes les souches de *C. trachomatis* ano-rectales envoyées au CNR a permis de mettre en place rapidement une surveillance de cette épidémie en France.

Sensibilité aux antibiotiques

Les études de sensibilité aux antibiotiques concernent peu de souches pour des raisons liées à la technique elle-même, qui est fastidieuse et de lecture difficile et du fait du peu d'isolats cliniques car les cultures cellulaires que ce soit en diagnostic ou en contrôle post thérapeutique sont de moins en moins pratiquées.

Les antibiotiques testés sont actifs avec des CMI semblables à celles décrites dans la littérature. Récemment il a été décrit des infections récurrentes chez des patients ayant bénéficié d'un traitement adapté suggérant un échec thérapeutique. Ces échecs thérapeutiques n'ont pas été documentés sur le plan microbiologique à savoir qu'aucun mécanisme de résistance n'a été trouvé chez ces souches récurrentes. Certains auteurs ont décrit des souches présentant une résistance hétérotypique c'est à dire que seul un petit nombre de bactéries était capable de survivre à des concentrations d'antibiotiques supérieures à la CMI. La possibilité d'une acquisition de résistance sous traitement se pose d'autant plus que la sélection de souches résistantes par mutation après pression de sélection *in vitro* est possible [4]. Ces résultats posent la question de l'intérêt du contrôle post-thérapeutique.

CONCLUSION

L'analyse géotypique et l'isolement de souches sont faisables à partir d'échantillons conservés congelés ce qui permet de faire des études épidémiologiques d'envergure nationale. Tous les géovars décrits dans l'infection génitale à *C. trachomatis* sont présents sur le territoire français. Les géovars prédominants (E et F) sont ceux qui prédominent dans les autres pays. Grâce à la connaissance des géotypes circulants, il est possible par géotypage à partir des échantillons biologiques de déceler tout événement nouveau.

L'étude de la sensibilité de quelques souches aux antibiotiques les plus utilisés n'a pas mis en évidence de souches résistantes mais l'existence de souches hétérotypiques incite à la surveillance, notamment des souches isolées dans les cas de récurrences ou d'échecs thérapeutiques.

* Biologistes des laboratoires privés suivants :

Saint-Martin-de-Ré (Dr Raguenaud), Bourges (Dr Prieur), Saint Ismier (Dr Blachier), Metz (Dr Scheppeler-Fuino), Nevers (Dr Ferrand), Strasbourg (Dr Dofföel), Mulhouse (Dr Kieffer), Lyon (Dr Zaoui), Le Mans (Dr Coude), Paris (Dr Bijaoui), Bondy (Dr Bianchi), Guadeloupe (Dr Weill)

et des laboratoires publics suivants :

Evreux (Dr Olivier), Toulouse (Rangueil : Dr Segonds, Purpan : Dr Lefevre), Bordeaux (Dr B de Barbeyrac), Angers (Dr Cottin), Reims (Dr Carquin), Strasbourg (Dr Jaulhac), Paris Saint-Louis (Dr Scieux).

RÉFÉRENCES

- [1] Rodriguez, P, Vekris A, de Barbeyrac B, Dutilh B, Bonnet J, Bébéar C. Typing of *Chlamydia trachomatis* by restriction endonuclease analysis of amplified major outer membrane protein gene. J. Clin. Microbiol. 1991, 29: 1132-6.
- [2] Cabra T, Jolly AM, Wylie JL. *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypic diversity and concordance with sexual network data. J. Infect Dis, 2003, 187: 279-86.
- [3] Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence of long term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. J. Infect Dis, 2000, 182: 909-6.
- [4] Dessus-Babus, S, Bébéar CM, Charron A, Bébéar C, de Barbeyrac B. Sequencing of gyrase and topoisomerase IV QRDRs of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained *in vitro*. Antimicrob. Agents. Chemother. 1998. 42: 2474-2481.