

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

ANNEE 2018

N° 91

Etude des mécanismes moléculaires de résistance aux β -lactamines des souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

MEMOIRE DU DIPLOME

MASTER 2 DE MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Présenté et soutenu publiquement le 30 Juillet 2018

Par

OUSMANE NIABALY

Né le 19/02/1980 à Koundara (République de Guinée)

MEMBRES DU JURY

PRESIDENTE:	Mme	Ndeye Coumba	TOURE-KANE	Professeur
MEMBRES :	M.	Makhtar	CAMARA	Professeur
	Mme	Halimatou	DIOP NDIAYE	Professeur
<u>DIRECTEUR DE MEMOIRE:</u>	M.	Abdoulaye	SECK	Maître-assistant

REMERCIEMENTS ET DEDICACES

Hommage

A Allah l'Omniscient, l'Omnipotent, l'Omniprésent de m'avoir frayé le droit chemin, donné la force, la motivation et la patience pour mener à bien ce travail.

Au prophète Mahomet (PSL)

Aux maîtres et juges

A Mme le **Professeur Ndeye Coumba Toure-Kane**

Cher Maître,

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury.

Votre rigueur scientifique et vos qualités humaines nous ont fascinés à plus d'un titre. C'est ici l'occasion pour nous de vous rendre un vibrant hommage.

Veillez accepter cher maître l'expression de nos sincères remerciements

A Monsieur **Abdoulaye Seck** pour m'avoir accueillie dans son Unité de Laboratoire de Biologie Médicale et toute l'équipe de LBM de l'Institut Pasteur

Cher Maître, les mots me manquent aujourd'hui pour dire merci.

Votre grand amour pour la science et la qualité de vos enseignements nous ont marqué. Je suis fier d'être l'un de vos nombreux élèves. Je vous témoigne toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur **Makhtar Camara**

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Au-delà de vos qualités scientifiques et humaines reconnues par tous, votre simplicité, votre disponibilité, vos critiques et suggestions vont largement améliorer la qualité de ce travail. Trouver ici nos sincères remerciements et l'expression de notre profonde gratitude.

A Mme le **Professeur Halimatou Diop Ndiaye**

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail nous réjouit.

Plus qu'un honneur, c'est une joie pour nous, de vous compter parmi nos juges et de pouvoir profiter de vos compétences.

Nous vous prions, cher maître, d'accepter nos vifs remerciements et notre profonde gratitude.

Au Professeur Cheikh Saad Bouh Boye Coordinateur du Master, pour les opportunités de formation que vous offrez aux étudiants Africains afin de parfaire leur cursus et d'apporter leur contribution à l'évolution de la Microbiologie. Veuillez accepter, cher maître, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.

SINCERES REMERCIEMENTS

A mon maitre et directeur de mémoire, **Dr Abdoulaye Seck** de m'avoir accueilli, proposé ce sujet et permis de réaliser mes études graduées dans son unité de laboratoire LBM de l'Institut Pasteur de Dakar. Votre curiosité, votre passion pour la recherche et votre rigueur scientifique transparaît par votre désir de transmettre vos connaissances sont des qualités qui m'ont grandement inspiré durant mes études. Vous avez été un excellent mentor et j'aimerais sincèrement vous remercier pour votre patience, votre support, votre disponibilité et l'autonomie que vous m'aviez laissée afin de mener bien ce travail. Je suis fier d'être l'un de vos nombreux étudiants. Je vous en témoigne toute ma gratitude. Longue vie à vous.

Au **Dr Amadou Sall** Directeur Général de l'Institut Pasteur de Dakar. En témoignage de notre reconnaissance.

Au **Dr Raymond Berçion** chef laboratoire, pour vos qualités professionnelles qui méritent toute admiration et tout respect. Veuillez accepter, l'expression de notre profond respect et notre reconnaissance.

Aux biologistes de l'Institut Pasteur de Dakar :

Dr Chantal Mahou, vos remarquables qualités humaines, votre grande disponibilité, vos connaissances et vos conseils m'ont été une grande aide précieuse pour la réalisation de ce mémoire et lors de mon stage au Laboratoire de Bactériologie Médicale de l'IPD

Soyez assurée de notre sincère reconnaissance

Dr Thierno Diallo, vos remarques, vos suggestions ont contribué à l'amélioration et la réalisation de ce travail. Soyez assurée de notre profonde gratitude

Dr Babacar Ndiaye, vos conseils et vos encouragements m'ont été d'une grande utilité. Trouvez ici l'expression de notre gratitude

Au **Major Ousmane Cissé**, **Mr. Alioune Mbaye**, **Mr Elh. Malick Fall** vos conseils et vos encouragements m'ont été une grande utilité. Recevez ici l'expression de notre reconnaissance.

A Mme le **Professeur Amy Gassama** pour la réalisation de la PCR dans son unité de Biologie Moléculaire et toute l'équipe de l'UBE de l'IPD.

Au **Dr Cheikh Fall**, **Dr Oumar Faye** pour la révélation des produits de la PCR et toute l'équipe de la Virologie de l'IPD pour leur sympathie et leur aide scientifique.

Au **Dr Louise Anta** et toute l'équipe de l'infirmerie de l'IPD, pour leur soutien à des moments difficiles.

Durant mon stage de mémoire au LBM, j'ai eu la chance de côtoyer des gens formidables. Je désire sincèrement remercier chacun(e) des membres de l'équipe passés et présent particulièrement :

Mme Rokhaya Mbaye, Mme Thiam Yamilé, Mme Rouguiatou Diallo, Mme Fatou Mbaye, Mme Estelle Gnaty, Mr Armel Bissila, Mme Fatou Kiné Diagne, Mme Marieme Sankaré, Mme Senghor Anne Marie, Mme Ndiaye Habybatou, Mlle Mariame Diop, Abou Diop, Libasse Niang, Lamine Fall, Cheikh Oumar, Ahmet Niama Coulibaly, Mahoudia Ndour, Aimé Sambou pour leurs encouragements, leur soutien et leur aide scientifique sans qui ce travail ne serait-ce qu'il est.

Au défunt **Mame Birame Ndiaye**, pour l'impression de mes articles de recherche durant mon stage. Qu'Allah puisse te pardonner et t'accueillir dans son Paradis céleste.

Je tiens à remercier également l'ensemble de tout le personnel de l'Institut Pasteur de Dakar avec qui j'ai collaboré durant mon stage au Laboratoire de Bactériologie Médicale.

A l'ensemble des **Docteurs et Professeurs** rencontrés à la Faculté de Médecine de l'UCAD au cours de notre formation du Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée.

Mme Cissé Dior Dieng, Mme Bois Khadidiatou Niang Secrétaire Département 3^e Cycle pour leur aide et leur disponibilité sans faille.

A mon cher ami **Dr Amadou Diallo**, pour votre soutien sans faille, pour avoir été là dans des moments les plus difficiles, pour m'avoir orienté dans la vie.

Au **Dr Cheikh Saadi Bou Diop**, Médecin Chef du Centre de Santé de Cambéréne, votre accueil, vos remarquables qualités humaines et vos encouragements.

Au Major du Laboratoire du C.S. Cambéréne **Dr El hadj Libasse 2 Ndiaye** pour l'accueil l'encadrement et soutien indéfectible.

Mme Ndoye Aïssatou pour m'avoir encadré, encouragé et soutenu tout au long de ce travail.

A mon "Tonton" Mr. **Mamadou Dione** pour l'encadrement et des conseils précieux

A ma collègue de service **Mme Henriette Diouf** pour des moments agréables partagés

Tous et toutes techniciens au Laboratoire du C.S.Cambéréne présents et passés pour toute votre attention. Ce travail est aussi le vôtre.

Au **Dr El hadj Malick Ndiaye** pour votre humanisme et votre gentillesse sans limite.

Au Major **Mme Haby Tall** et toute son équipe de l'infirmerie du C.S.C.

A **Mr Assane Ka**, Président du Comité, **Mandione Niang** pour vos soutiens.

A tout le personnel du Centre de Santé de Cambéréne de Dakar, de la Clinique Lamp Fall (Kasnack) de Kaolack, pour vos encouragements et des moments agréables partagés.

En témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A ma famille aux **P.A.U.5** pour son soutien inconditionnel particulièrement ma chère **Tante Astou "Alanso" Sande**. Longue vie à vous avec une meilleure santé.

A mon cher frère: **Mamadou Sande "Gaucher "** et sa femme **Mme Sande Thioro Gning**.

A mes cousins et cousines **Moussa Sande, Amadou Sande, Djenabou Sy, Hadji, El hadj, Farin, Keba, Koumba, Mame Diarra,**

Merci ma famille tutrice **Mme Binette TOURE, Mme Ndiaye ATHIA KA,** pour leur soutien indéfectible.

Je remercie la téréngala sénégalaise pour l'accueil chaleureux.

Dédicace :

Je dédie ce travail :

A mon cher ami-frère le **Dr Amadou Diallo et sa famille.**

Puisse Allah vous accorde une longue vie avec une meilleure santé.

Au **Professeur Falaye Traoré**, vos encouragements nous ont été d'une grande utilité

Soyez assuré de notre reconnaissance.

A mes chers frères : **Mamadou Konko, Mamadou Sounkarou, Moussa, Diouma...**

En témoignage de toute l'affection et les profonds sentiments fraternels que je vous porte et de l'attachement qui nous unit.

A mes chères sœurs : **Mme Mariama Kéké, Fatoumata Gnassira, Hadyan et Marie Nioké**

Merci pour votre présence physique et morale à chaque fois que j'en avais besoin !

Ce travail est le fruit des liens sacrés qui nous unissent.

A mes oncles: Mr. **Waliba Niabaly, Sounkarou Niabaly, Kerfala Nioké, Manka Nioké,**

A mes tantes : Mme **Fatoumata Traoré, N'na Ténin Nioké, Mariama Ntité,**

A mes neveux, nièces, cousins et cousines : **Kerfala Manè, Saran, Kemo, Boubacar, Nihény Camara, Djiguiba Camara, Mamadou Lamarana, Justin Mansa, Matou, Mariama Sankara, Aicha, Lountan Lucien, Labbo Niang...**

A tous mes proches et amis : **Ousmane Diallo, Jean Salomon Bongono, Samuel Guilavogui Mamadou Ciré Sow, Mamadou Saliou Diallo, Mamoudou Magassouba, Amadila Boiro, Sakony Condé, Hadia Sow...**

A tous mes collègues de promotion du Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et de l'Université de Nzérékoré

Particulièrement à mon frère et ami **Dr Kaba Djiba** pour sa disponibilité et son aide scientifique.

Je vous dédie ce travail en témoignage de l'amitié, des profonds sentiments fraternels qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

En fin à la brave et vaillante équipe de l'unité du Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.

A la mémoire de mes parents : feu mon père **Lountan et** ma mère **Fatou Nioké**

En témoignage des peines, les prières et sacrifices que vous avez consentis

Mes grands-parents : **Ousmane et Djenabou Noumoulo Nioké**

Mes chères sœurs : **Djenabou Noumoulo, Aïssatou Niabaly**

Mes tantes : **Hortense Tambalou, Pobyla Camara, « Yayé Bambé », Lamarana Sande**

Mes oncles : **Boubacar Thialany Nioké, M'pouna**

Mes beaux-frères : **Tidiane Mané, Sana Bruno Niabaly**

Aucun mot ne pourra exprimer ma grande tristesse en votre absence...

Vos visages gais et souriants...

Votre tendresse infinie...

Et votre amour incomparable...

Resteront gravés dans mon cœur...

Je vous remercie pour tous les beaux moments que nous avons passés ensemble en famille...

Je vous remercie pour votre grand Amour...

Vous me manquez beaucoup...

J'aurai tant aimé que vous soyez à mes côtés ce jour...

Mais le destin en a décidé autrement...

J'espère que vous êtes fier de moi...

Je vous aime...

Que vos âmes reposent en paix... Amine.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARNr	: Acide Ribonucléique ribosomique
BCC	: Bouillon Cœur-Cervelet
BET	: Bromure d'Ethidium
CA-SFM	: Comité d'Antibiogramme de la Société Française et de la Microbiologie
CDC	: Center for Disease Control and Prevention
CO₂	: Dioxyde de Carbone
<i>C. trachomatis</i>	: <i>Chlamydia trachomatis</i>
C3G	: Céphalosporine de 3 ^{ème} Génération
CMI	: Concentration Minimum inhibitrice
dNTP	: désoxyNucléotide TriPhosphate
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GSC	: Gélose au Sang Cuit
GSO	: Gélose au Sang Ordinaire
H₂O	: Dioxyde d'Hydrogène
ICE	: Élément d'Intégration et Conjugaison
IPD	: Institut Pasteur de Dakar
IST	: Infection Sexuellement Transmissible
LBM	: Laboratoire de Biologie Médicale
LPS	: Lipo poly saccharides
<i>N. gonorrhoeae</i>	: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
PCR	: Polymérase Chain Réaction
PPI	: Pour Préparation Injectable
PLP	: Protéine Liant les Pénicillines
RAM	: Résistance aux antimicrobiens
RIS	: Résistant Intermédiaire Sensible
SIDA	: Syndrome Immunodéficience Acquis
TBE	: Tris Borate EDTA
TEM	: Béta-lactamase plasmidique

UBE : Unité de Bactériologie Expérimentale
UV : Ultra-violet
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VCN : Vancomycine Colistine Nystatine

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Aspectde gonocoque après coloration au Gram.....	2
Figure 2: Structure antigénique d'espèce du genre <i>N. gonorrhoeae</i>	4
Figure 3: Données de la prévalence du <i>gonocoque</i> dans les différents pays du monde.....	5
Figure 4: Détection dugène <i>pilQ</i>	21
Figure 5: Détection dugène <i>ponA</i>	21
Figure 6: Détection dugène <i>TEM-1</i>	21
Figure 7: Détection dugène <i>porB</i>	22
Figure 8: Détection du gène <i>gyrA</i>	22

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre <i>Neisseria</i>	3
Tableau II: Fiche d'interprétation de l'antibiogramme de <i>N. gonorrhoeae</i>	16
Tableau III: Amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones.....	18
Tableau IV: Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex.....	18
Tableau V: Programme PCR des gènes de résistance	19
Tableau VI: Profil de résistance des souches isolées	20
Tableau VII: Répartition des gènes identifiés en fonction des souches.....	23

TABLE DES MATIERES

Introduction

Première partie : Revue de la littérature

I. Généralités sur <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2
I.1. Historique.....	2
I.2. Taxonomie.....	2
I.3. Caractères bactériologiques	2
I.3.1. Morphologie	2
I.3.2. Caractères culturels.....	2
I.3.3. Caractères biochimiques	3
I.3.4. Caractères antigéniques.....	3
I.3.5. Habitat	4
I.3.6. Mode de transmission	4
I.3.7. Pouvoir pathogène	4
I.4. Epidémiologie	4
I.5. La gonococcie	6
I.5.1. Les complications et les formes extra génitales	6
I.6. Immunité et réponse immunitaire.....	7
I.6.1. Immunité	7
I.6.2. Réponse immunitaire	7
I.7. Diagnostic bactériologique de la gonococcie.....	8
I.7.1. Prélèvements.....	8
I.7.2. Examen microscopique direct	8
I.7.3. Culture.....	9
I.7.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	9
I.7.5. Diagnostic moléculaire.....	9
I.8. Traitement et prévention	10
II. Résistance du <i>gonocoque</i> aux antibiotiques	10
II.1. Mécanismes de résistance	10
II.2. Gènes de résistance aux antibiotiques	11

II.2.1. Bétalactamines.....	11
II.2.2. Quinolones	11
II.2.3. Cyclines.....	12
II.2.4. Macrolides	12
II.2.5. Aminosides.....	13

Deuxième Partie : Travail Expérimental

I. Objectif	14
II. Cadre de l'étude	14
III. Matériel et méthode	14
III.1. Matériels et réactifs	14
III.2. Méthodologie	15
III.2.1. Souches bactériennes	15
III.2.2. Prélèvement	15
III.2.3. Isolement	15
III.2.4. Conservation des souches	15
III.2.5. Etude du profil de sensibilité aux antibiotiques	15
III. 2.6. L'extraction de l'ADN bactérien.....	17
III. 2.7. Détection des gènes de résistance.....	17
IV. Résultats.....	20
IV.1. Profil de résistance aux antibiotiques.....	20
IV.2. Détection des gènes de résistance aux antibiotiques.....	21
V. Discussion	24

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes



Introduction

La gonococcie est la deuxième infection sexuellement transmissible la plus répandue au monde après celle à *C. trachomatis* [1, 4, 28]. Cette infection pose un problème majeur de santé publique dont la prise en charge fait partie intégrante des stratégies de prévention du VIH[12].

Depuis l'avènement de l'antibiothérapie le *gonocoque* n'a cessé de développer de résistances aux antimicrobiens [3,16]. La première résistance décrite était celle à la pénicilline après quelques années de la mise sur le marché de cet antibiotique, ensuite des résistances aux cyclines puis aux quinolones ont été rapportées [39, 75, 77].

Depuis quelques années, l'apparition de souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines de troisième génération qui constituent le traitement de première ligne est menacée [5, 15, 17].

Aujourd'hui, la recrudescence des gonococcies dues à des souches résistantes est inquiétante particulièrement chez les populations en âge de procréer et qui se singularisait par une activité sexuelle accrue, parfois non protégé malgré les politiques de prévention initiées avec l'infection au VIH [9, 52, 59].

C'est dans ce contexte que nous avons mené cette étude dont l'objectif général est d'étudier les mécanismes moléculaires de résistance aux β -lactamines des souches de *gonocoque* isolées au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.

Les objectifs spécifiques de cette étude :

- Caractériser phénotypiquement les souches de gonocoques
- Déterminer le profil de résistance aux antibiotiques
- Rechercher les gènes impliqués dans la résistance aux β -lactamines.



**Première partie : Revue de la
littérature**

I. Généralités sur *Neisseria gonorrhoeae*

I.1. Historique

Neisseria gonorrhoeae ou gonocoque a été découvert en 1979 par Albert Neisser dans un pus urétral et oculaire. Il a réussi à cultiver la bactérie sur sang placentaire. Il donna le nom de *N.gonorrhoeae*[19, 21].

I.2. Taxonomie

Le gonocoque appartient au genre *Neisseria* et à la famille des *Neisseriaceae*. Seules deux espèces de *Neisseria* sont considérées comme pathogènes spécifiques chez l'homme : *N.gonorrhoeae* et *meningitidis* [1, 10, 11].

I.3. Caractères bactériologiques

I.3.1. Morphologie

Les gonocoques sont des diplocoques à Gram négatif asporulés accolés par leur face concave, en forme de « grain de café » et dont chaque élément mesure environ 0,7 à 1 micron. Ils peuvent être intra ou extracellulaire [20, 25, 44].

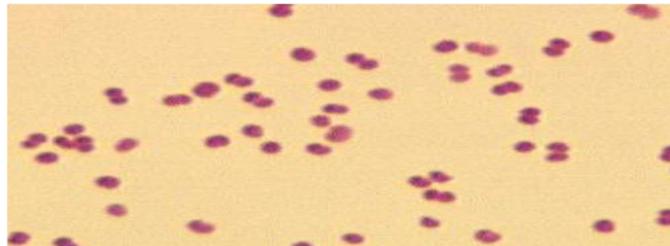


Figure 1: Aspect de *gonocoque* après coloration au Gram

(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Neisseriagonorrhoeae>) consulté le 19/10/2016

I.3.2. Caractères cultureux

Les gonocoques sont des germes fragiles sensibles à la dessiccation et exigeants [19, 63]. Ils se cultivent à 37°C sur gélose chocolat, enrichie de supplément vitaminique (Poly Vitex, supplément G) et additionnée d'un mélange d'antibiotiques (Vancomycine, colistine et nystatine ou V.C.N.) pour inhiber la croissance des bactéries commensales[19, 28].

I.3.3. Caractères biochimiques

Neisseria gonorrhoeae possède un cytochrome oxydase et une catalase comme tous les autres *Neisseria*. Il acidifie les milieux contenant du glucose mais est sans action sur les milieux contenant les sucres : maltose, saccharose et fructose (cf. tableau I) [19, 20].

Tableau I: Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre *Neisseria* [39]

Espèces	Morphologie bactérienne	Croissance sur milieu sélectif	Pigment	Oxydase	Catalase	Acidification des sucres			
						Glu	Mal	Sac	Lac
<i>Neisseria</i> pathogènes									
<i>N. gonorrh.</i>	Cocci	+	Absence	+	+	+	-	-	-
<i>N. méning.</i>	Cocci	+	absence	+	+	+	+	-	-

I.3.4. Caractères antigéniques

Les gonocoques sont constitués de deux systèmes membranaires où logent des antigènes bien caractérisés (cf. figure 2) [44, 60]. De l'extérieur à l'intérieur :

- Les pili : Ils sont portés par les types T1 et T2 de Kellogg et jouent un rôle dans les phénomènes d'adhérence au niveau de la muqueuse génitale empêchant l'expulsion du germe par le flux urinaire [25]. Ils sont formés de polymères protéiques présentant une grande variation immunologique. Leur présence est liée à l'aspect des colonies à la surface de la gélose, à la compétence pour la transformation et à la virulence [14, 25].

- La capsule : elle est constituée de polysaccharide. Elle joue un rôle dans la pathogénicité en protégeant le germe contre la phagocytose [75].

- Les Lipopolysaccharides: jouent un rôle toxique dû à la partie lipide et interviennent dans l'expulsion des cellules ciliées de la muqueuse.

- Les antigènes des enveloppes externes jouent un rôle important dans les phénomènes d'attachement [26, 39]. Il existe 3 protéines principales :

- Protéine I : elle est également appelée « Protéine majeure de Swanson » C'est la protéine la plus abondante. Son poids moléculaire est de 34 kilo dalton. Elle a un rôle de porine, c'est-à-dire qu'elle permet le passage de petites molécules à travers la membrane. Les anticorps anti protéine I sont bactéricides et pourraient conférer une certaine protection.

- Protéine II : protéine mineure ou protéine d'opacité, son poids moléculaire est de 24 kilo-daltons. Elle joue un rôle dans l'adhésion des gonocoques les uns aux autres et également dans l'adhérence aux cellules de l'hôte.

- Protéine III : son poids moléculaire est de 11 kilo-daltons. Elle serait liée à la protéine I.

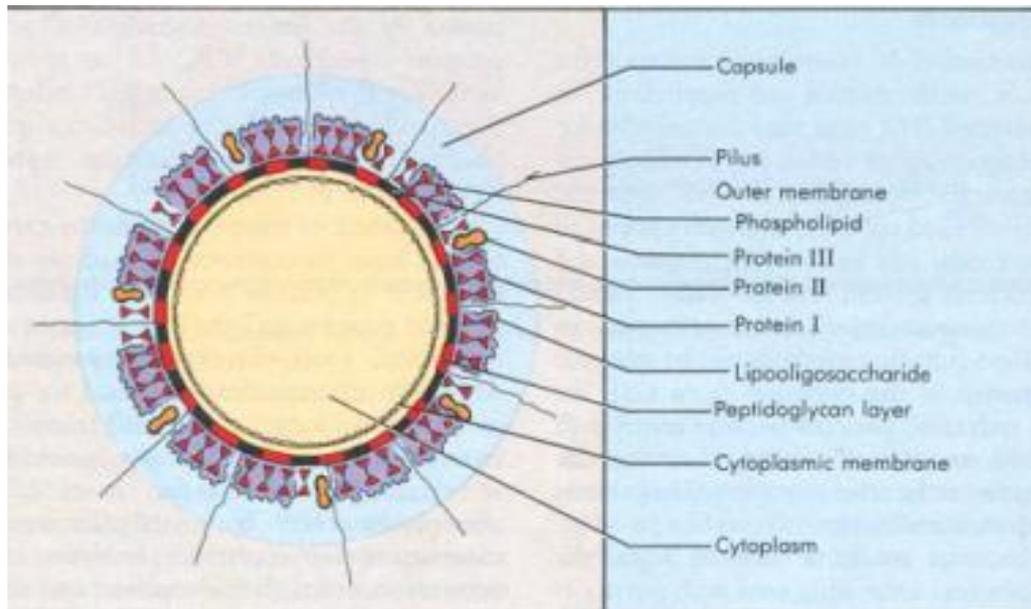


Figure 2: Structure antigénique d'espèce du genre *N. gonorrhoeae* [39].

I.3.5. Habitat : Le gonocoque est un germe fragile et exigeant. On le retrouve dans la nature qu'à l'état saprophyte. Il est toujours parasite des muqueuses et sous muqueuses [1, 8]. C'est une bactérie pathogène obligatoire uniquement retrouvée chez l'homme [1].

I.3.6. Mode de transmission : Sa transmission est presque exclusivement sexuelle. La contamination du nouveau né se fait pendant l'accouchement [1, 32].

I.3.7. Pouvoir pathogène : Le principal site du gonocoque chez la femme est l'endocol et chez l'homme le tractus urétral. Il ne résiste pas dans la nature car il est très fragile et sensible aux variations de température et de pH [19, 28].

I.4. Epidémiologie

L'incidence de la gonococcie a considérablement chuté dans les pays de l'Europe de l'ouest après un pic dans les années 70, et les nouveaux cas sont le plus souvent importés [55, 56, 62].

Dans tous les pays du monde, l'incidence de l'infection à gonocoque a augmenté ces dernières années et est, évaluée périodiquement par l'OMS, est passée de 62 millions de cas en 1999 à 106 millions en 2010 par an [29, 55, 56]. Ces données ne reflétaient certainement que

partiellement la réalité, en raison d'un diagnostic fréquent de l'infection (particulièrement) dans les zones à forte prévalence et de l'absence de déclaration dans certains pays [55, 62].

La distribution de l'infection est très inégale entre les pays ; dans les régions les plus affectées telles que l'Afrique subsaharienne, l'Asie du sud-est, les Caraïbes, l'Amérique latine. Les taux d'incidences dans ces régions sont souvent dix fois supérieurs à ceux des pays industrialisés (Cf. figure 3).

En Afrique, la prévalence de l'infection à *gonocoque* chez les sujets symptomatiques en 2006 est comprise entre 5,7 et 17,7% [9].

Globalement les pays en développement paient le plus lourd tribut, ils ont des taux d'incidence significativement supérieurs à ceux des pays développés [9, 55, 83], et la distribution au sein de ces pays diffère aussi en fonction de l'environnement socio-économique des populations.

En Guinée-Bissau en 2001 une étude portant sur 231 personnes dont 200 femmes et 31 hommes, a montré que 17% des femmes étaient infectées 38,7% des hommes étaient infectés par *Neisseria gonorrhoeae* [7].

Au Sénégal, en 2004 la prévalence des infections à *Neisseria gonorrhoeae* était estimée à 5,4% chez les prostituées dans le cadre d'une enquête nationale et surveillance combinée [13]. En 2007, cette prévalence était de 2,6% [83].

Le *gonocoque* est actuellement reconnu dans la plupart des pays développés comme la seconde infection sexuellement transmissible [12, 21], (IST) d'origine bactérienne après l'infection à *Chlamydia trachomatis*.



Figure 3: Données de la prévalence du gonocoque dans les différents pays du monde (entre 2005 et 2010) [12].

I.5. La gonococcie

Neisseria gonorrhoeae est responsable d'une IST dénommée gonococcie, communément appelée la blennorragie ou chaude de pisse [19, 39].

L'incubation de l'infection dure en principe moins de cinq jours mais peut dépasser quinze jours [1, 19, 20].

Chez l'homme, la forme bruyante peut se manifester sous forme d'un écoulement purulent, de coloration jaunâtre s'accompagnant de brûlures à la miction. Il existe chez certains patients une balanite (inflammation du gland) [11, 21, 65].

Chez la femme, le plus souvent il s'agit d'une forme asymptomatique. Dans ce cas, la gonococcie débute par une phase aigüe se caractérisant par une uréthro-cervicite avec des symptômes discrets à type pollakiurie, de brûlures, de pertes contenant de pus [28]. La cervicite est la manifestation la plus courante et elle se traduit par des leucorrhées, jaunes ou blanches, parfois peu différentes en quantité des pertes physiologiques. Elle est dans 50 à 90% des cas totalement asymptomatique [28]. L'examen au spéculum montre une fragilité du col de l'utérus, des sécrétions mucopurulentes. Une urétrite est souvent associée à une cervicite [11].

Chez le nouveau-né, il y a risque de contamination mère-enfant qui se traduit par une ophtalmie néonatale pouvant aller jusqu'à la cécité.

I.5.1. Les complications et les formes extra génitales

Une infection par le gonocoque non diagnostiquée et donc non traitée, est susceptible de se compliquer et d'entraîner une orchio-épididymite.

L'inflammation de l'épididyme, (l'épididymite), est presque toujours associée avec une inflammation du testicule dans le cadre d'une orchio-épididymite [4, 25]. Parfois les deux épididymes sont atteints, ce qui provoque une obstruction des canaux évacuateurs et une hypofertilité. L'évolution peut se faire vers l'inflammation de la prostate [1, 11], ou des vésicules séminales qui sont alors affectées par la suite. Chez certains patients, la survenue d'une conjonctivite gonococcique, due à la transmission du germe par l'intermédiaire des mains peut être observée. Une septicémie gonococcique peut être également mal observée [12].

Chez la femme, les complications de l'infection gonococcique non diagnostiquée peuvent être particulièrement sévères. En effet, il peut survenir des maladies pelviennes inflammatoires, avec comme conséquences, des séquelles à long terme telles que des douleurs pelviennes, une grossesse ectopique et une infertilité [63, 65].

Autres complications après l'infection

Les complications possibles pouvant survenir après une gonococcie sont [19, 20]: l'arthrite gonococcique, la gonococcie cutanée, la péri hépatite, la kératodermie gonococcique, l'endocardite infectieuse, la méningite gonococcique, la poly chondrite gonococcique.

La vulvo-vaginite de la fille se caractérise par la présence de rougeur, d'œdème de la vulve, pertes vaginales contenant du pus[8]. L'infection se transmet par contact direct soit par des objets souillés soit par des sécrétions provenant des adultes[4, 12].

La gonococcie du nouveau-né et plus particulièrement l'ophtalmie à gonocoque : La conjonctivite va se manifester dès la première semaine de la vie et se compliquer quelquefois d'ulcérations susceptibles d'aboutir à une cécité visuelle [11, 25]. Cette pathologie est quelque fois confondue à une infection à *chlamydia trachomatis*.

I.6. Immunité et réponse immunitaire

I.6.1. Immunité

Il n'y a pas de protection contre une réinfection chez l'homme et les récurrences sont fréquentes ; la raison en est inconnue. Il faut noter la liaison des infections gonococciques disséminées avec une déficience en certains composants du complément, en particulier en C6, C7, C8[60] ; celle-ci a été rendue responsable d'une certaine prédisposition aux infections à *Neisseria*.

I.6.2. Réponse immunitaire

In vivo, la souche infectante essaie d'échapper aux défenses anti infectieuses de l'hôte en modifiant régulièrement la structure de ses déterminants de virulence (pili et protéine P2). Ces constituants sont immunogènes et l'hôte développe par exemple vis-à-vis d'une protéine P2 de structure définie, une réaction immunitaire à l'humorale et cellulaire. Les gonocoques élaborent alors une nouvelle protéine P2 jusque-là inconnue du système immunitaire, et le phénomène peut se répéter plusieurs fois [60, 66].

Ainsi par ce mécanisme raffiné, les gonocoques peuvent persister dans les tissus en dépit de la mise en œuvre d'une réponse immunitaire de l'hôte. Cette hétérogénéité antigénique dans l'espèce *Neisseria gonorrhoeae* est un obstacle majeur à l'élaboration d'un vaccin anti gonococcique et explique les récurrences chez un même sujet [60, 78].

I.7. Diagnostic bactériologique de la gonococcie

Le diagnostic est généralement direct reposant sur la mise en évidence du germe. Le prélèvement se fait à l'aide d'un écouvillon [1, 25, 75]. La qualité du prélèvement, la nature de l'écouvillon et le respect des conditions de transport sont primordiaux.

I.7.1. Prélèvements

Chez l'homme, on effectue un prélèvement urétral par écouvillonnage. L'écouvillon est introduit dans le canal urétral sur 2 à 3 cm (ampoule urétrale) en lui imprimant un mouvement de rotation pendant 5 à 10 secondes pour lui permettre de s'imprégner des sécrétions, puis retiré lentement avec un angle incliné doux [19, 25]. Ce prélèvement est réalisé préférentiellement le matin avant toute miction ou toilette intime ou à défaut, après une abstention mictionnelle d'au moins 2 heures. En cas de difficulté de réaliser le prélèvement urétral, le recueil des premiers jets des urines peut permettre la culture de la bactérie [40, 43].

Chez la femme le prélèvement se fait aussi par écouvillonnage endocervical puisque le gonocoque présente un tropisme préférentiel pour l'endocol [19, 27]. Au niveau de l'urètre : s'il n'y a pas d'écoulement visible, l'urètre est pressé vers l'orifice externe pour faire apparaître l'exsudat ; si aucune sécrétion n'est obtenue il faut alors introduire un écouvillon dans le canal urétral et le tourner pendant 5 secondes en prenant le soin de masser d'abord l'urètre contre la symphyse pubienne [19, 25].

Autres types de prélèvements

En fonction du contexte clinique, divers prélèvements peuvent être effectués :

- Un écouvillonnage est effectué en insistant sur les cryptes amygdaliennes au niveau du pharynx à l'aide d'un abaisse-langue et d'une bonne source de lumière, un écouvillonnage est effectué en insistant sur les cryptes amygdaliennes [1, 63].
- Un écouvillonnage au niveau du rectum à l'aide d'une anoscopie ou d'un rectoscope lubrifié à la vaseline chez les homosexuels
- Le recueil du 1^{er} jet des urines.

I.7.2. Examen microscopique direct

Les sécrétions sont étalées en couche mince sur une lame. Le frottis est séché à l'air, fixé puis coloré au Gram [1, 19]. L'observation au microscope en immersion permet la détection des diplocoques à Gram négatif intra ou extracellulaire en « grain de café » [20, 25].

I.7.3. Culture

La culture reste le gold standard pour le diagnostic de l'infection gonococcique chez un patient symptomatique [1].

La culture exige le respect des conditions de conservation et de transport des prélèvements pour assurer la vitalité du *gonocoque* [1, 4, 19], ce qui est parfois difficile compte tenu des conditions et contraintes locales.

La culture s'effectue sur des milieux spéciaux : une gélose chocolat, contenant des suppléments vitaminiques, un mélange d'antibiotiques (Vancomycine, Colistine, Nystatine) permettant l'inhibition des bactéries commensales. L'incubation des géloses ensemencées s'effectue immédiatement dans une étuve enrichie CO₂, à 37 °C [19]. Les colonies apparaissent sous forme de petite taille surélevées, grises ou beiges, brillantes, opaques et translucides après 24 à 48 heures d'incubation [25].

L'identification bactérienne se fait sur la base des caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

La culture permet également d'évaluer l'efficacité du traitement d'une infection gonococcique en cas d'échec thérapeutique ou chez un patient ayant des rapports sexuels avec une personne infectée non traitée [4, 19].

I.7.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité du gonocoque aux antibiotiques varie selon les types d'antibiotiques. Actuellement les antibiotiques les plus actifs sont : Les céphalosporines de la troisième génération, les aminosides et les macrolides [3, 16, 29]. L'étude de la sensibilité ou de la résistance aux antimicrobiens est évaluée en fonction de l'antibiogramme.

I.7.5. Diagnostic moléculaire

C'est une technique d'hybridation moléculaire qui peut être réalisée à partir d'urines. L'ARNr est détecté par l'utilisation d'une sonde ADN spécifique [14, 73, 74]. C'est la méthode de choix des techniques de la biologie moléculaire. Elle peut être pratiquée sur un simple jet d'urine chez l'homme ou chez la femme, prélèvement au niveau de l'endocol chez la femme ou de l'urètre chez l'homme [43, 79].

La biologie moléculaire n'est pas recommandée pour un contrôle de l'efficacité du traitement [43]. Si elle est la seule option offerte, elle doit être effectuée trois semaines ou beaucoup plus tard après le traitement pour éviter les résultats faussement positifs due à la présence résiduelle de micro-organismes non viables ou débris de gènes d'ADN [7, 10].

I.8. Traitement et prévention

Si la symptomatologie est évocatrice d'une gonococcie, un traitement probabiliste est instauré en fonction des recommandations en vigueur et permet d'éviter la contamination des autres [3, 59]. Les schémas conseillés pour le traitement des urétrites et cervicaux-vaginites utilisent : les aminosides (spectinomycine) et les céphalosporines de troisième génération avec la ceftriaxone et la céfotaxime qui restent encore efficaces [36, 28, 57].

En l'absence de vaccin sur le marché, la seule prévention efficace demeure l'éducation sexuelle en insistant sur :

- la Fidélité des partenaires
- la Prévention (préservatifs)
- l'utilisation du gel gonococcique

Chez le nouveau-né, l'ophtalmie purulente peut-être prévenue par l'instillation d'un collyre à l'érythromycine à 0,5% ou à la tétracycline à 1% [63, 65].

II. Résistance du gonocoqueaux antibiotiques

Un antibiotique est défini comme un composé chimique, naturellement produit par un microorganisme ou, produit de synthèse dont l'activité thérapeutique se manifeste à faible dose et d'une manière spécifique [22, 69, 80]. Il a le pouvoir d'inhiber la croissance voire détruire d'autres bactéries.

L'antibiorésistance est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques [52, 58, 67]. Cette résistance confère donc à celui-ci un avantage sélectif qui lui permet de se multiplier en présence de l'antibiotique.

Actuellement nous avons deux types de résistances des gonocoques aux antibiotiques [16, 48, 45]. Le premier mode de résistance porte sur l'ADN chromosomique et le second concerne l'ADN extra chromosomique [46, 71, 76].

II.1. Mécanismes de résistance

N. gonorrhoeae a une capacité à modifier son matériel génétique, étant donné qu'il est naturellement compétent pour la transformation [33, 69, 70] (transfert de gènes partiels ou entiers) pendant tout son cycle de vie et peut modifier son génome par des mutations. La plupart des déterminants génétiques chez *N. gonorrhoeae* sont situés au niveau chromosomique, et seuls les gènes *bla_{TEM1}* [18, 24, 26] et *tetM* [85, 89] qui aboutissent à une résistance élevée à la pénicilline et à la tétracycline sont connus pour être portés par un plasmide et hébergés par la bactérie [6, 34, 61].

En outre, le transfert horizontal de gènes est un processus par lequel des fragments d'ADN et des éléments génétiques mobiles peuvent être transférés entre les bactéries de même ou de différentes espèces [64, 68, 69]. Ces éléments comprennent entre autres les transposons (éléments d'intégration et de conjugaison : (ICE) les intégrons, les îlots génomiques, intégrés dans les chromosomes [18, 68, 79].

II.2. Gènes de résistance aux antibiotiques

II.2.1. Bétalactamines

Jusqu'au milieu des années 1980, la pénicilline G était utilisée en première intention dans le traitement des gonococcies [37, 53]. Mais la pression de sélection de cet antibiotique a provoqué l'émergence de souches de gonocoques résistantes à la pénicilline G, obligeant l'arrêt de son utilisation. Les deux mécanismes de résistance décrits sont les mutations chromosomiques et l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique [34, 42, 84]. La résistance à la pénicilline à médiation chromosomique chez les gonocoques est due à des mutations qui modifient les protéines liant les pénicillines (PLP) [6, 53, 72]. Cette résistance transmise verticalement à la descendance touche aujourd'hui près de 95% des souches de *N. gonorrhoeae* [24]. Le gène *pilQ* entraîne des mutations de la sécrétine, *ponA* entraîne des mutations de la protéine liant la pénicilline PBP1, *porB* à l'origine d'une imperméabilité par mutation au niveau de la porine PIA ou PIB code pour les tétracyclines, *TEM-1* gène plasmidique code une pénicillinase [31]. Le gène *penA* code la résistance au ceftriaxone par mutation au niveau de la protéine liant la pénicilline PBP2, la résistance multiple transférable (*mtrR* code une protéine répresseur transcriptionnel qui module l'expression de l'opéron d'une pompe à efflux) [51, 81, 82].

Les pénicillinases sont des enzymes portées par des plasmides, éléments génétiques mobiles à transmission verticale et horizontale (à une autre souche de la même espèce) [33, 34, 58], parfois même entre espèces différentes (notamment les *Neisseria* de la flore commensale). Les pénicillinases confèrent un haut niveau à la pénicilline G (CMI entre 1 à plus de 64mg/L) [62]. Cette enzyme hydrolyse la liaison amide cyclique des pénicillines sensibles à la β -lactamase, ouvrant ainsi le cycle β -lactame et rendant inactif la pénicilline [26, 37, 89].

II.2.2. Quinolones

Le développement des résistances aux pénicillines et aux cyclines a entraîné une modification du traitement de première intention des gonococcies en faveur des fluoroquinolones [2, 23, 30]. Cependant, l'utilisation de ces molécules a provoqué une émergence de souches résistantes en

Afrique, en Asie et dans de nombreux pays européens [38, 47, 49]. Les cibles d'action des quinolones sont les enzymes bactériennes ADN gyrase et topo- isomérase IV. Les sous-unités de l'ADN gyrase sont codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, celles du topo isomérase IV par les gènes *par* Cet *parE* [80, 86, 87]. La résistance acquise aux quinolones implique surtout des mutations chromosomiques par substitution d'acides aminés dans une région des sous-unités des *gyrA* ou *parC* [41, 50, 73]. La résistance aux quinolones peut également être médiée par des plasmides produisant une protéine codée par les *qnr* qui protège les cibles des quinolones [23, 32, 35].

II.2.3. Cyclines

La résistance à la tétracycline est médiée par un plasmide [22]. Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines qui aboutit à un effet bactériostatique [69]. Elles ont été utilisées dans le passé pour le traitement des gonococcies mais ne sont actuellement plus recommandées car des résistances se sont développées avec ces molécules [22, 75]. La proportion de souches résistantes aux tétracyclines est très importante [57]. Deux mécanismes sont impliqués : la résistance d'origine chromosomique et celle plasmidique : la résistance chromosomique due à la modification de la cible des β -lactamines que sont les PLP (protéines liant la pénicilline)[73].La résistance plasmidique confère un haut niveau de résistance (CMI de la tétracycline entre 16 et 64 mg/L)[57, 69] elle est due au transfert de gène à partir des souches de streptocoques, du gène *TetM* codant pour la protéine *tetM* qui protège la cible ribosomale de l'action des cyclines[57, 80, 84].

II.2.4.Macrolides

Les macrolides sont peu utilisés pour le traitement des gonococcies car ils ont une activité modérée sur *Neisseria gonorrhoeae*, à l'exception de l'azithromycine (CMI la plus basse), efficace à une dose élevée de 2g mais responsable de fréquents effets secondaires digestifs [16]. Des souches de sensibilité diminuée ou résistante à l'azithromycine ont été décrites en 2003 en Espagne et au Royaume-Uni, et sont de plus en plus fréquemment observées dans certains pays d'Europe [69, 73].

Ce développement de résistance peut s'expliquer par le fait que l'azithromycine est un antibiotique à demi-vie longue communément prescrit par les cliniciens dans diverses infections et notamment en cas d'infection à *C. trachomatis* [10], or si un patient atteint de chlamydie présente une co-infection à gonocoque, l'azithromycine pourrait présenter une pression de sélection sur le gonocoque [41, 65].

II.2.5. Aminosides

La spectinomycine, un aminoside réservé au traitement de la gonococcie, est utilisé en cas d'allergie aux C3G chez l'adulte de plus de 15 ans [28, 52, 54] (sauf chez la femme enceinte). Actuellement, la résistance à la spectinomycine, à haut niveau, est extrêmement rare chez les souches de gonocoques [52, 77, 88].



Deuxième Partie : Travail Expérimental

I. Objectif

L'objectif de notre étude était de déterminer le profil de sensibilité et des déterminants génétiques de la résistance aux β -lactamines et aux quinolones de souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.

II. Cadre de l'étude

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) et de l'Unité de Bactériologie Expérimentale (UBE) de l'Institut Pasteur de Dakar entre Aout 2016 et Octobre 2017.

III. Matériel et méthode

III.1. Matériels et réactifs

Divers matériels ont été utilisés pour le prélèvement, l'examen microscopique, la culture, l'identification et l'antibiogramme :

Matériels de prélèvement :

- Ecouvillons en alginate
- Eau physiologique

Matériels pour l'examen microscopique :

- Lames
- Lamelles
- Microscopie optique
- Colorants de Gram

Matériels pour culture :

- Pipette Pasteur
- GSO
- GSC + Poly Vitex
- GSC + Poly Vitex + VCN
- Galerie Api NH
- Etuve à (CO₂)
- Bec Bunsen

Matériels pour l'identification et l'antibiogramme :

- Disque d'oxydase
- Pincettes

- Disques d'antibiotiques
- Distributeur d'antibiotiques
- Automate ADAGIO™ Bio rad
- Disque de céfinase
- Cryotubes Nunc
- BCC

III.2. Méthodologie

III.2.1. Souches bactériennes

Notre étude a été réalisée sur 86 souches de *Neisseria gonorrhoeae* dont 57 isolats identifiés entre 2014 et 2015 conservés au LBM et 29 entre Aout 2016 et Octobre 2017.

III.2.2. Prélèvement

Les patients ne doivent avoir de rapport sexuel la veille du prélèvement. L'homme doit adopter une position assise avec jambes écartées.

Les écoulements urétraux sont prélevés au niveau du méat à l'aide de deux écouvillons en alginate dont l'un est réservé pour étalement sur lame et l'autre à ensemer immédiatement sur les géloses (GSO, GSC + Poly Vitex ou Poly Vitex + VCN).

III.2.3. Isolement

Les gélosesensemencées étaient incubées à l'étuve à 37°C en présence de CO₂ en 24h.

Les souches ont été identifiées sur la base des caractères morphologiques (diplocoque à gram négatif), culturels (aspect des colonies) et biochimiques (à l'aide de la galerie Api NH).

III.2.4. Conservation des souches

Les souches isolées et identifiées étaient conservées à – 80°C dans des Cryotubes Nunc contenant du lait écrémé.

III.2.5. Etude du profil de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélose selon les recommandations du CASFM (EUCAST) version 2017. La sensibilité ou la résistance était évaluée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition suivant les valeurs définies (Cf. tableau II). La suspension bactérienne était réalisée à partir d'une culture pure de 24-48 heures et ajuster

de 0,5 Mc Farland dans de l'eau physiologique à 0,85% de Na cl puis ensemencée sur la gélose chocolat sans VCN par inondation puis incubé à 5% CO₂ à 24h et à 37°C.

La production d'une β-lactamase était recherchée à l'aide d'un disque de céfinase (Bio Mérieux).

La céfinase est une céphalosporine chromogène dégradée par la β-lactamase produite par la bactérie, entraînant ainsi une coloration rouge.

Tableau II: Fiche d'interprétation de l'antibiogramme de *N. gonorrhoeae*

Antibiotiques	Code	Charge	Diamètres	R I S	C M I estimée
Pénicilline	PEN	6µg	6	R	> 1
Oxacilline	OXA	5µg	6	R	
Chloramphénicol	CHL	30µg	28	R	≤4
Rifampicine	RAM	30µg	15	R	0.5
Acide Nalidixique	NAL	30µg	8	R	
Ciprofloxacine	CIP	5µg	12	R	≤ 0.03
Céfotaxime	CTX	30µg	19	S	1
Spiramycine	SPN	100µg	24	S	1
Erythromycine	ERY	15µg	22	S	0.25
Ceftriaxone	CRO	30µg	24	S	≤ 0.12
Tétracycline	TET	30µg	6	R	> 1
Spectinomycine	SPT	100µg	21	S	≤ 64

R : résistant ; **I** : intermédiaire ; **S** : sensible

III. 2.6. L'extraction de l'ADN bactérien

L'ADN bactérien était extrait par le Quick-DNA™ Miniprep Plus (Cf. annexe 2).

Sa pureté était évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume (Nanodrop) par mesure de l'absorbance à 260 nm (Cf. annexe 3).

III. 2.7. Détection des gènes de résistance

Les gènes de résistance aux β -lactamines (*pilQ*, *ponA*, *blaTEM-1*, *porB*, *penA*, *mtrR*) et aux fluoroquinolones (*gyrA*) ont été réalisés par PCR en fonction du profil de résistance aux antibiotiques en utilisant des amorces spécifiques (Cf. Tableau III). L'étude moléculaire a été réalisée sur 29 souches de *N. gonorrhoeae*.

Tableau III: Amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones.

Gènes	Primers	DNA Séquences (5' → 3')	Taille (bp)	Tm
<i>mtrR</i>	<i>mtrR</i> -F	GCCAATCAACAGGATTCTTA	425	50°C
	<i>mtrR</i> -R	GTTGGAACAACGCGTCAAAC		
<i>porB</i>	<i>porB</i> -F	CCGGCCTGCTTAAATTTCTTA	980	50°C
	<i>porB</i> -R	TATTAGAATTTGTGGCGCAG		
<i>ponA</i>	<i>ponA</i> -F	GAGAAAATGGGGGAGGACCG	1200	55°C
	<i>ponA</i> -R	GGCTGCCGCATTGCCTGAAC		
<i>pilQ</i>	<i>pilQ</i> -F	CGTTACGCCGAACATCACG	950	50°C
	<i>pilQ</i> -R	TGACCGAAACTGAACGGACTG		
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -1-F	AACCTGCCCCGTCAGCCTTGA	980	55°C
	<i>gyrA</i> -2-A	GGACGAGCCGTTGACGACCAG		
<i>penA</i>	<i>penA</i> -F	GGAATTCTTCAGACGGCGAAGTAAAAATGTTGATTAAGCG	250	55°C
	<i>PenA</i> -R	GAGAGAATTCTTAAGACGGTGTGTTGACGG		
<i>blaTEM1</i>	<i>BlaTEM1</i> -F	CGCTCATGAGACAATAACCCTGG	1050	55°C
	<i>BlaTEM1</i> -R	GGGTCTGACGCTCAGTGGAACG.		

Tableau IV: Composition du mélange réactionnel pour une PCR simple

Réactifs	Concentration	Quantité en μ l pour une réaction simple
PCR buffer	10X	4 μ l
Amorce F	20 μ l	0,5 μ l
Amorce R	20 μ l	0,5 μ l
EAU PPI		12,5 μ l
Répartition mix		17,5 μ l
ADN		2,5 μ l
Volume final		20 μ l

Amplification des gènes de résistance

Les mélanges réactionnels (mix) ont été répartis dans des tubes PCR (eppendorfs) 0,2ml placés dans un thermocycleur programmé selon les gènes de résistance recherchés (Cf. Tableau V).

Tableau V: Programme PCR des gènes de résistance

Paramètres	<i>mtrR</i>	<i>porB</i>	<i>ponA</i>	<i>pilQ</i>	<i>gyrA</i>	<i>penA</i>	<i>TEM1</i>
<i>Dénaturation initiale</i>	94°C/5'						
<i>Dénaturation</i>	94°C/30''						
<i>Appariement (Tm*)</i>	50°C/1'	50°C/1'	55°C/1'	50°C/1'	55°C/1'	55°C/1'	55°C/1'
<i>Elongation</i>	72°C/1'						
<i>Elongation finale</i>	72°C/10'						
Nombre de cycles	25	25	25	25	25	25	25

Tm* : température d'hybridation en fonction du gène rechercher(Cf. tableau V)

Migration et visualisation des gènes

Des gels d'agarose à 1% ont été préparés de 1 g de poudre d'agarose contenu dans 100 ml de tampon TBE 1X (10 ml de TBE + 90ml H2O) et 0,5 mg/l de BET. La migration des produits PCR a été réalisée sous une tension de 90 volts pendant 30 mn.

La visualisation des bandes au niveau du gel contenant du bromure d'éthidium a été réalisée sous UV avec l'appareil photographique Doc printer.

IV. Résultats

IV.1. Profil de résistance aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches de gonocoques aux antibiotiques a montré des résistances à la pénicilline (81,4%), à l'oxacilline (68,6%), à la tétracycline (63,9%), à l'acide nalidixique (60,5%), à la ciprofloxacine (43%), à la rifampicine (7%) et au chloramphénicol (4,6%). Aucune souche résistante n'a été observée avec la céfotaxime, la spiramycine, l'érythromycine, la spectinomycine et la ceftriaxone (Cf. Tableau VI). La production de β -lactamase était de 51,2% (n=44).

Tableau VI: Profil de résistance des souches isolées

Antibiotiques	N	Pourcentage %
PEN	70	81,4
OXA	59	68,6
CTX	0	0
CRO	0	0
NAL	52	60,5
CIP	37	43
SPT	0	0
ERY	0	0
SPN	0	0
TET	55	63,9
CHL	4	4,6
RAM	6	7

PEN : pénicilline ; **OXA** : oxacilline ; **CTX** : céfotaxime ; **CRO** : ceftriaxone ; **NAL** : acide nalidixique ; **CIP** : ciprofloxacine ; **SPT** : spectinomycine ; **ERY** : érythromycine ; **SPN** : spiramycine ; **TET** : tétracycline ; **CHL** : chloramphénicol ; **RAM** : rifampicine

IV.2. Détection des gènes de résistance aux antibiotiques

Les gènes *pilQ* et *ponA* ont été détectés respectivement chez 29 souches (100%) et 27 souches (93,1%) (Cf. figures 4 et 5).



Figure 4: Détection du gène *pilQ*



Figure 5: Détection du gène *ponA*

Quatorze (14) souches hébergeaient le gène *TEM-1* (48,3%) (Cf. Figure 6).



Figure 6: Détection du gène *TEM-1*

Les gènes *porB* et *gyrA* ont été détectés respectivement sur 12 (41,3%) et 29 isolats (100%) (Cf. figure 7 et 8).

1 2 3 4 5 MT 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 MT 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

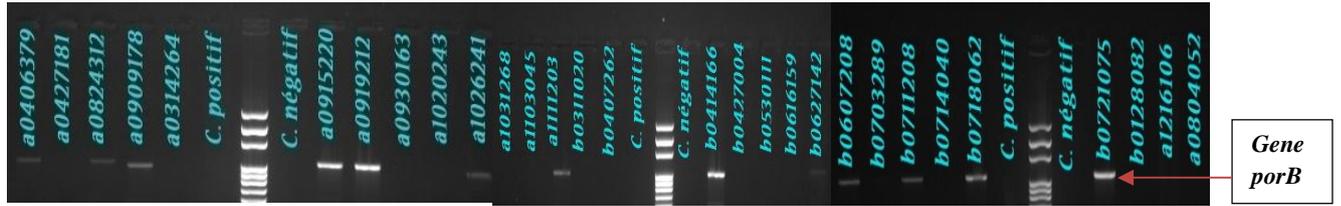


Figure 7: Détection du gène *porB*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29



Figure 8: Détection du gène *gyrA*

Les gènes *mtrR*, *penA* n'ont pas été détectés sur les 29 souches analysées.

MT: marqueur de taille ; C+ : Contrôle positif ; C- : Contrôle négatif

Tableau VII: Répartition des gènes identifiés en fonction des souches

<i>N°</i>	<i>pilQ</i>	<i>ponA</i>	<i>TEM-1</i>	<i>porB</i>	<i>gyrA</i>	<i>penA</i>	<i>mtrR</i>
1	+	-	-	+	+	-	-
2	+	+	-	-	+	-	-
3	+	-	-	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	-	-	+	-	-
6	+	+	-	+	+	-	-
7	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	-	+	-	-
9	+	+	-	-	+	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	-	+	-	-
12	+	+	-	-	+	-	-
13	+	+	-	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+	-	-
15	+	+	+	-	+	-	-
16	+	+	-	+	+	-	-
17	+	+	+	-	+	-	-
18	+	+	+	-	+	-	-
19	+	+	+	-	+	-	-
20	+	+	+	-	+	-	-
21	+	+	-	+	+	-	-
22	+	+	+	-	+	-	-
23	+	+	-	+	+	-	-
24	+	+	+	-	+	-	-
25	+	+	+	+	+	-	-
26	+	+	-	+	+	-	-
27	+	+	+	-	+	-	-
28	+	+	-	-	+	-	-
29	+	+	+	-	+	-	-

+ : présence de gène, - : absence de gène

V. Discussion

Cette étude rétro prospective portant sur le profil de résistance aux antibiotiques et sur les mécanismes moléculaires de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones des souches de gonocoque isolées au LBM de l'Institut Pasteur de Dakar a été réalisée entre août 2016 et octobre 2017.

L'étude du profil de sensibilité a concerné 86 souches alors que la détection des gènes de résistance a été réalisée sur 29 isolats.

L'étude de la sensibilité des souches de gonocoque aux antibiotiques a montré des résistances élevées à la pénicilline (81,4%), à l'oxacilline (68,6%), à la tétracycline (63,9%) à l'acide nalidixique (60,5%). La résistance à la ciprofloxacine était de 43%. Des résistances faibles ont été observées avec la rifampicine (7%) et le chloramphénicol (4,6%). Aucune souche résistante n'a été observée avec la céfotaxime, la ceftriaxone, la spiramycine, l'érythromycine, la spectinomycine (molécule de choix pour le traitement de la gonococcie). Des taux de résistance différents ont été rapportés au Mali (Souleymane et al. 2010) [75] avec 44% pour la pénicilline et 93% pour la tétracycline, en Guinée Bissau (Birgitta et al. 2008) [7] 68% pour la pénicilline et 74% pour la tétracycline, et au Nord-Ouest de l'Ethiopie (Martha et al. 2013) [50] avec 85,2% de résistance à la pénicilline et un taux moyen de résistance à la tétracycline (29,6%).

Dans ces trois pays, aucune résistance n'a été observée avec la spectinomycine, la ceftriaxone, et la céfotaxime comme c'est le cas dans notre étude.

En Europe, les résultats de la surveillance de la résistance des souches de gonocoque isolées sur 21 pays en 2013 ont montré un taux de résistance de 4,7% (93/1994) au céfixime associée à la ciprofloxacine dont 17,2% des isolats étaient aussi résistants à l'azithromycine (Cole et al., 2015) [15].

Dans notre étude la production de β -lactamase était de 51,2% (n=44). Alors qu'un taux de 68% de souches productrices de β -lactamase a été décrit en Guinée Bissau (par Birgitta et al. 2008) [7].

Cette étude montre que les céphalosporines de 3^{ème} génération, les aminosides et les macrolides doivent être privilégiés dans le traitement de première de ligne d'une gonococcie chez les patients adultes à Dakar.

Dans notre étude, nous n'avons pas réalisé de séquençage pour rechercher les mutations au niveau de ces différents gènes.

Les gènes de résistance *pilQ* (100%), *PonA* (93,1%) et *TEM-1* (48,3%) ont été détectés respectivement dans nos isolats.

Zhao et al.2018[88] ont trouvé le gène *pilQ* sur les 28 isolats testés, mais aucune mutation n'a été observée sur ces souches isolées en Chine.

Une étude réalisée au Canada en a montré la présence du gène *ponA* sur la totalité des souches (n=155) avec présence d'une altération L421P (Martin et al 2010)[51]. Les travaux réalisés par Lee et al. (Lee et al. 2010)[72] en Séoul, ont décrit la présence de ce gène sur les 48 isolats testés avec une mutation chez 91,6% des isolats (seuls 4 souches étaient de type sauvage).

Le gène *TEM-1* a été détecté chez 48,3% de nos isolats. Une étude menée au Guangzhou en Chine entre 2002 et 2012 a montré la présence du gène TEM-1 chez 77,5% des souches analysées (1068/1378) (Zheng et al)[89]. Un taux de 79,4% (96/121) a été décrit sur les isolats de gonocoque de Bangkok, dont le séquençage du gène a montré la présence du variant TEM-135[53].

Dans notre étude, le gène *penA* n'a pas été détecté sur les 29 souches analysées. Ceci est en accord avec le profil de sensibilité de nos souches, toutes sensibles au ceftriaxone. Ailleurs, des isolats résistants à cette molécule ont décrits :60% (93/155) des souches étudiées par Martin et al.[51] au Canada contenaient l'allèle mosaïque de ce gène ; alors que 100% (n=28) des isolats analysés par Zhao et al. (Zhao et al. 2018)[88] hébergeaient ce gène (dont 2 souches avec l'allèle mosaïque et 26 avec l'allèle non mosaïque).L'étude menée par Lee et al. [72] a montré la présence de ce gène la totalité des souches (n=48) avec une mutation de la PBP2.

Le gène *gyrA* a été trouvé chez 100% des isolats testés. Ce même taux a été décrit par Bhatti et al.[2] sur 110 souches de gonocoque dont 44% avaient une mutation au niveau du gène *gyrA* et 56% étaient de type sauvage. Une étude menée à Taïwan sur 107 gonocoques résistants à la ciprofloxacine a décrit la présence du gène *gyrA* sur la totalité des souches avec au moins une mutation (Ser91Phe) (Zhao et al. 2013) [87].L'étude menée par Hermarajata et al. [35] sur 100 souches de gonocoques dont 23 souches sensibles à la ciprofloxacine et 77 résistantes à cette molécule ont montré la présence du gène *gyrA* sur la totalité des isolats avec le type sauvage identifié sur les souches sensibles et la mutation Ser 91 sur celles résistantes.

Le gène *porB* a été détecté chez 41,3% des souches alors que Lee et al.[72] ont trouvé ce gène chez 100% de leurs isolats dont 97,9% avec une mutation, seule une souche était de type sauvage.

Le gène *mtrR* n'a pas été détecté sur les 29 souches analysées.Des études ont rapporté la présence de ce gène sur la totalité des souches étudiées. Ainsi, Lee et al.[72] ont trouvé ce gène sur toutes les souches de gonocoque analysées avec présence d'une délétion au niveau du nucléotide A (83,3%) ou d'un gène tronqué ou d'une substitution. Zhao et ses coll., [88] ont

également décrits ce gène sur la totalité des isolats analysés avec une substitution L421P au niveau de PBP1.

Vu l'émergence de la résistance des souches de gonocoque à travers le monde surtout avec la recrudescence des IST dues à ce germe chez les populations jeunes, il est important de sensibiliser les populations pour prévenir cette infection mais aussi de mettre en place une surveillance de la résistance aux antibiotiques.



Conclusion

Cette étude a été réalisée sur 86 souches de *Neisseria gonorrhoeae* dont 57 isolats identifiés entre 2014 et 2015 conservés au LBM et 29 entre Aout 2016 et Octobre 2017 à l'IPD.

L'analyse du profil de sensibilité a montré une résistance à la pénicilline (81,4%), à l'oxacilline (68,6%), à la tétracycline (63,9%), à l'acide nalidixique (60,5%), à la ciprofloxacine (43%), à la rifampicine (7%) et au chloramphénicol (4,6%). Aucune souche résistante n'a été observée avec la céfotaxime, la spiramycine, l'érythromycine, la spectinomycine et la ceftriaxone. La production de β -lactamase était de 51,2% (n=44).

L'analyse moléculaire a montré que des souches hébergeaient au moins un gène de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones. Les gènes de résistance *pilQ* 100% (n=29), *ponA* 93,1% (n=27), *TEM-1* 48,3% (n=14), *porB* 41,3% (n=12), *gyrA* 100% (n=29) ont été détectés respectivement. Les gènes *penA* et *mtrR* n'ont pas été trouvés sur les 29 souches analysées. Ceci est en accord avec le profil de sensibilité de nos souches, toutes sensibles au ceftriaxone.

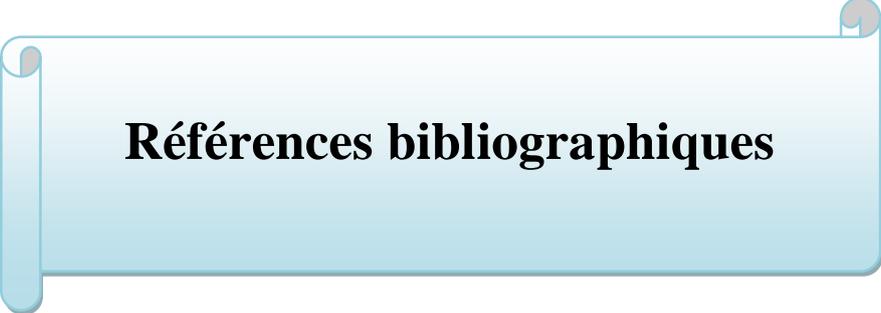
Le séquençage de ces gènes permettra d'identifier la présence ou non de mutations au niveau des gènes *pilQ*, *ponA*, *TEM-1*, *porB* et *gyrA*.

Ces gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones sur ces souches de *Neisseria gonorrhoeae* pourraient être portés par les supports génétiques (plasmides, transposons et intégrons). L'étude de ces supports génétiques permettra d'élucider la coexistence de ces différents gènes de résistance aux différentes familles d'antibiotiques.

Ces souches constituent un risque épidémiologique puisqu'elles assurent la co-sélection de déterminants de résistance favorisant ainsi leur dissémination.

La surveillance de cette résistance des souches permettra d'élaborer des algorithmes de traitement à partir de l'écologie locale sur lesquels pourront se baser les cliniciens pour traiter en première intention la gonococcie urétrale à bactérie multi résistantes.

La collaboration de tous les acteurs autour de l'utilisation des antibiotiques est primordiale pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens (RAM) avec la notion " One Health". Les pouvoirs publics, les biologistes, les médecins, les pharmaciens, les vétérinaires, les environnementalistes, les hygiénistes, les infirmières, les autres personnels de santé et les scientifiques doivent ensemble prendre les mesures nécessaires pour surveiller et maîtriser tous les aspects désastreux de la RAM, et éviter à l'humanité la venue prochaine de l'ère post-antibiotique.



Références bibliographiques

- 1. Akingeneye J., bogies J., mukantabana V., Piot P. Teller W.M, Vandick.**
Diagnostic des infections génitales à *gonocoque*, *chlamydiae* et *mycoplasmes*. Médecine et hygiène, 1996, vol 54, n°2103.
- 2. Ashima A. Bhatti and al.** Epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae gyrA* genotype, Los Angeles, California, USA 2016 Emerging infectious Diseases www.cdc.gov [Pub Med]
- 3. Apalata T, TF Zimba, Sturm WA, et coll.** Profil de sensibilité aux antimicrobiens de *Neisseria gonorrhoeae* isolé chez des patients fréquentant une installation de traitement des MST à Maputo, au Mozambique. Sex Transm. Dis 2009; 36 : 341-3.
- 4. Avril J. L, Dabernat H., Denis F. et coll.** Bactériologie Clinique. Ellipses Edition marketing S.A. Paris, 2000; 355-361.
- 5. Barry PM, Klausner JD.** L'utilisation des céphalosporines pour la gonorrhée: le problème imminent de la résistance. Expert Opin. Pharmacothérapie 2009; 10: 555-577.
- 6. Bissonnette L., S. Champetier, J. P. Buisson, and P. H. Roy** 1991. Characterization of the no enzymatic chloramphenicol résistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. J Bacterial 173:4493-502
- 7. Birgitta Olsen, Fredrik Manson and al.** Phenotypic and genetic characterization of bacterial sexually transmitted infections in Bissau, Guinea-Bissau, West Africa: a prospective cohort study 2008BMJ J. Antimicrobial Chemotherapy [Pub Med]
- 8. Borge D. et Coll.** Approche épidémiologique des maladies sexuellement transmissibles en milieu ouvrier. MedAF Noire 1980; 27
- 9. British Association for Sexual Health and HIV 2005, CDC and Prevention Sexually 2006**
- 10. Cao V., Ratsima E., Van Tri D., et coll.** Vulnérabilité antimicrobienne des souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées en 2004-2006 à Bangui, en République centrafricaine; Yaoundé, Cameroun; Antananarivo, Madagascar et Ho Chi Minh Ville et Nha Trang, Vietnam. Sex Transm Dis 2008; 35: 941-5
- 11. Cates W. JR, Holmes KK.** The epidemiology of *gonorrhoeae*, *Chlamydia* infection and *syphilis* in four African cities. AIDS 2001, 15sup 4: S 79-88.
- 12. Centers for Disease Control and Prevention** Sexually transmitted disease treatment Guide lines, 2006.London: MMWR 2006; 55:1-94.
- 13. Cissé C.** Thèse de Doctorat en pharmacie. Prévalence des infections sexuellement transmissibles (VIH, *Human papillomavirus*, *chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*) chez les professionnelles du sexe au Sénégal (enquête nationale et surveillance combinée) N° 146, 2011.

14. **Chan, J. W., and P. H. Goodwin** 1995 Extraction of genomic DNA from extracellular polysaccharide-synthesizing gram-negative bacteria. *Biotechniques* 18:418-22.
15. **Cole and al.** Is the tide turning again for cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Europe? Results from the 2013 European surveillance *BMC infectious Diseases* 15 :321
16. **Coulaud JP.** Résistance du *gonocoque* aux antibiotiques, applications pratiques. *Médecine d'Afrique Noire* 1991; 38(1), 73-4
17. **David M. Whiley and al.** Alterations of the *pilQ* gene in *Neisseria gonorrhoeae* unlikely contributors to decreased susceptibility to ceftriaxone and céfixime in clinical gonococcal strains 2014
18. **Davies, J.** 1994 Inactivation of antibiotics and the dissemination of résistance genes. *Science* 264:375-82.
19. **Debrueres J.S., Sedallinane** Isolement de *gonocoque* et pathologie biologique. 1985, 33 (687-692)
20. **Denis F, Ploy MC, Martin C., Bingen E.** Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris, Masson, 2007. 287-294
21. **Dépistage et prise en charge de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae*** état des lieux et propositions - HAS - Décembre 2010
22. **Dosso M.** Le point des résistances du gonocoque vis-à-vis des antibiotiques en Afrique. *Pathologie génito-urinaire* 1995 : 1 : 45-51
23. **Drlica, K. et X. Zhao** L'ADN gyrase, le topo isomérase IV et les 4 quinolones 1997 *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 61: 377-392.
24. **Dowson, C. G., T. J. Coffey, and B.G. Spratt.** 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated résistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* 2:361-6.
25. **Dyck., Meheus ZA.** Diagnostic au laboratoire des maladies sexuellement Transmissibles. Organisation Mondiale de la Santé Genève, éd. En Malaisie 2000
26. **Edouard Bingen** Mécanisme d'action des bétalactamines. De la structure bactérienne à la structure de la molécule. Service de bactériologie du Dr Lambert-Zechovsky Hôpital Bretonneau, 2, rue Carpeaux-75018 Paris
27. **Edwards JL., Apicella MA.** The molecular mechanisms used by *N. gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and woman. *Clin Micro biol Rev.* 2004-17:965-981
28. **Elonore, Rebecca Alimi** Dépistage et Traitement des infections à gonocoque en Médecine de ville. Thèse de doctorat en médecine. Université Paris DIDEROT-Paris 7-2004
29. **Emergence de gonocoques résistants aux C3G en France** –Maladies Infectieuses numéro

- 30. Fiorito, S., P. Galarza, I. Pagano, et coll.,** 2001. Emergence d'une souche de *Neisseria gonorrhoeae* résistante à la ciprofloxacine à haut niveau à Buenos Aires, Argentine Sex. Transm Infect. **77**:77.
- 31. Folster JP., Dhulipali V., Shafer WM. and al.** 2007 Differential regulation of *ponA* and *pilMNOPQ* expression by the *Neisseria gonorrhoeae* *mtrR* transcriptional regulatory protein. J. Bacteriol. **189** :4569-4577. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00286-07>.
- 32. Gallay A., Bouyssou-Michel A., Lassau F., Basselier B., Sednaoui.**
Les infections à *Neisseria gonorrhoeae* en France en 2006: progression importante chez les femmes et augmentation persistante des résistances à la ciprofloxacine. BH 2008. 5-6 :33-36
- 33. Gassama Sow, and al.,** Integrons in salmonella Keurmassar, Senegal Emerg. Infect Dis, 2004. 10 (7): p. 1339- 41
- 34. Gill MJ, Simjee S., Al-Hattawi K., et coll.** La résistance gonococcique aux β -lactames et à la tétracycline implique une mutation dans la boucle 3 de la porine codée au locus *penB*. Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42: 2799 à 2803
- 35. Hermarajata and al.** Performance and verification of a Real-Time PCR Assay Targeting the *gyrA* Gene for Prediction of Ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* J Clin Microbiol 2016; 54: 805-8 [Pub med]
- 36. HJ. De Vries, CM. Wind, MF. Schim and al.** Trends in antimicrobial susceptibility for azithromycine and ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Amsterdam, the Netherlands, between 2012 and 2015. Euro Surveill. 2017; 22(1): pii=30431 [Pub med].
- 37. Ibrahim Muhammad et al.** Characterization of *blaTEM* genes and types of β -lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*- The prevalent and conserved *blaTEM-135* has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin 2014
- 38. Institut National de Santé Publique du Québec**
La détection de l'infection gonococcique dans les Labo biomédicaux du Québec face à l'émergence de la résistance de *N. gonorrhoeae* à la ciprofloxacine. Montréal : Gouvernement du Québec, 2006
- 39. Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie** <http://www.institutpasteur.nc/> consulté le 29/11/2016
- 40. Intérêt d'une technique de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections à *N. gonorrhoeae*** Etude de 1165 patientes-par Céline Acker Medete- 2010. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie.
- 41. Ivens, D., I. Martin et Coll.** 2000 *N. gonorrhoeae* dans une clinique d'infections

sexuellement transmissibles à Londres qui n'est pas entièrement sensible aux quinolones: les isolats sont-ils importés et quelle est l'efficacité de la ciprofloxacine en tant que traitement de première intention? Int. J. STD AIDS 11: 774 à 776.

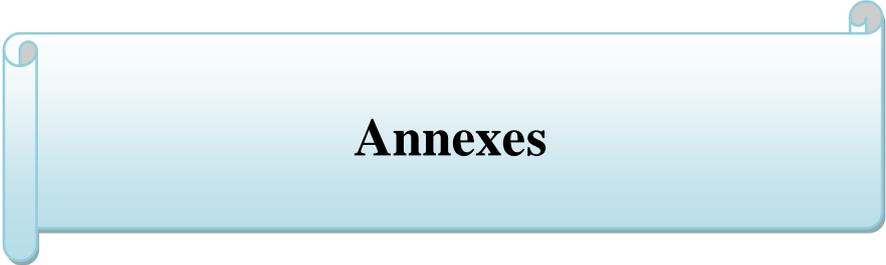
42. **Jacoby, G. A.** 1994 Extra chromosomal résistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. Trends Microbial 2:357-60.
43. **Kellogg ND., Baillargeon J., Lukefahr JL., Lawless K., Menar Sw.** Comparison of nucleic acid amplification tests and culture technique in the detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* in victims of suspected child sexual abuse pediatric adolescent gynecology 2004.17:331-339
44. **Khadija Drave Diop** Prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* dans les prélèvements génitaux examinés à l'Institut National de recherche en santé publique. Thèse de doctorat en pharmacie, université de Bamako-2002
45. **Levesque, C.S. Brassard, J. Lapointe, and P. H. Roy** 1994 Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several Integrons. Gène 142:49-54
46. **Lewis DA., Sriruttan C., Muller EE., Golparian D., Gumede L., Fick D. et coll.** Caractérisation phénotypique et génétique des deux premiers cas d'infection à *Neisseria gonorrhoeae* résistante à la céphalosporine à spectre étendu en Afrique du Sud et association avec l'échec du traitement par céfixime. J Antimicrob Chemother. 2013 ; 68 : 1267-1270
47. **Lewis DA., et coll.** 2008 Escalation la prévalence relative des *gonorrhoeae* résistante à la ciprofloxacine chez les hommes ayant un écoulement urétral dans deux villes sud – africaines: association avec la séropositivité au VIH. Sexe Transm. Infect. 84 : 352-355
48. **Mainardi JL, Goldstein Fw. et Gut MannL.** Mécanisme de résistance aux antibiotiques. Encyclopédie Med. Chir. Maladies infectieuses 1996
49. **Marcos P. Losada, Keith A. Crandall and al.** Distinguishing importation from diversification of Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* by molecular evolutionary analysis research article BMC Evolutionary Biology 2007, 7:84 [Pub med]
50. **Martha Tibebe, Ambachew Shibabaw et coll.** *Neisseria gonorrhoeae* non sensible aux céphalosporines et aux quinolones dans le nord-ouest de l'Éthiopie BMC infectious Diseases 2013, 13:415[Pub med]
51. **Martin Irene and al.** Emergence and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and céfixime in Canada. Sexually Transmitted Diseases Volume 39 Number 4, April 2012[Pub med]

- 52. Mérens A., Javier F., Coyne S., Cavallo JD.** Actualités de la résistance aux antibiotiques de *Neisseria gonorrhoeae* en 2008. *Antibiotiques* 2009 11: 97-105.
- 53. Nakayama S., Tribuddharat C., Prombhul S., Shimuta K., Srifuengfung S., Unemo M. and al.** Molecular analyses of *TEM* genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrobial Agents Chemother* 2012; 56(2):916-20
- 54. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T., Hoshina S., Iwasaku K. and al.** Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future of untreatable *gonorrhea*? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011;55(7):3538-45
- 55. OMS** Stratégie mondiale de lutte contre les infections sexuellement Transmissibles : 2006-2015. Genève: OMS; 2007
- 56. Organisation mondiale de la santé (OMS)** Incidence mondiale et prévalence de certaines infections sexuellement transmissibles curables - 2008. Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse
- 57. Organisation mondiale de la santé** Plan d'action mondial pour contrôler la propagation et l'impact de la résistance antimicrobienne chez *Neisseria gonorrhoeae*. 2012
- 58. Ploy, M., et coll.** Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immun analyse et Biologie spécialisée*, 2005.
- 59. Pechère M., Trellu L., Piguet V.** Préparons-nous au retour des maladies sexuellement transmissibles. *Médecine et Hygiène* 2003.61:1929-1932.
- 60. Post DMB, Phillips NJ, Shao JQ, Entz DD, Gibson BW. Apicella MA.** Intracellular cells: survival of *Neisseria gonorrhoeae* in male urethral epithelial cells: importance of a hex acyl lipid A. *Infect immune* 2002.70:909-920
- 61. Qin Xiaolin, Heping Zheng, Xing Zhong Wu and al.** The prevalence and epidemiology of plasmid-mediated penicillin and tetracycline resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Guangzhou, China, 2002-2012 *BMC Infectious Diseases* (2015) 15:412 [PubMed]
- 62. Rapport annuel d'activité CNR des gonocoques 2013** [Http : //www.institutfournier.org](http://www.institutfournier.org) consulté le 15/11/2016
- 63. Rapport d'orientation, dépistage et prise en charge de l'infection à *N.gonorrhoeae* :** Etats des lieux et propositions, Déc. 2010.
- 64. Recchia, G. D., and R. M. Hall.** 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integron. *Trends Microbial* 5:389-94.

- 65. Résistances aux antibiotiques** Recommandations sur la prise en charge de certaines infections sexuellement transmissibles - Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé - Afssaps - Novembre 2008 <http://www.un.org> consulté le 13/11/2016
- 66. Reynolds, A. E., S. Mahadevan, S. F. Leg rice and A. Wright** 1986 Enhancement of bacterial gene expression by insertion elements or by mutation in a CAP-cAMP binding site *J Mol Biol* 191:85-95 [Pub med]
- 67. Riesenfeld, C. S., R. M. Goodman, and J. Handelsman** 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6:981-9 [Pub Med]
- 68. Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel** 2002 The role of Integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med. Microbiol* 292:115-25.
- 69. Roy, P. H.** 1997. Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries, *Médecine/sciences* 13:927-933
- 70. Roy, P. H.** 1999 Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microbiology Today* 26:168-170
- 71. Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens, and L. Y. Li.** 1995 Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 59:579-90
- 72. Sang-Guk Lee and al.** Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *ponA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to Céfixime or Ceftriaxone 2010 *J. Antimicrob Chemother* 65: 669-675 [Pub med]
- 73. Sednaoui P., Goubard A. - Rapport d'activité 2011 du CNR des gonocoques - Institut Alfred Fournier - Laboratoire de Biologie Moléculaire** <http://www.institutfournier.org> consulté le 25/12/2016
- 74. Sitraka A. Andrianony** Molecular characterization of *salmonella* strains isolated from broiler farms in peril urban area of Dakar, Senegal, 2014.
- 75. Souleymane Ongoib** Sensibilité du *gonocoque* aux antibiotiques utilisés dans la prise en charge syndromique de l'écoulement urétral et /ou de la dysurie au Mali. Thèse de Doctorat en pharmacie, Univ. de Bamako, 2010.
- 76. Sox. TE, Mohammed W., Sparling PF.** 1979 Plasmides de *Neisseria gonorrhoeae* dérivés de la transformation avec structure et fonction modifiées. *J. Bacterial.* 138: 510-518
- 77. Stephen A.M., David I.T.** Prevalence and treatment of multi Drug resistant N.G. *Infect Med* 1995; 12: 609-618
- 78. Surveillance des souches de *N. gonorrhoeae* résistantes aux antibiotiques dans la province de Québec** Rapport 2009 Institut National de santé publique du Québec.
- 79. Tapsall Jw., Ndowa F., Lewis DA, and al.** Meeting the public health challenge of

multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev. Anti Infect Ther* 2009; 7: 821-34

- 80. Unemo M, Shafer WM. and al.** Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution and Future *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27: 587-613. Doi: 10.1128 / CMR.00010-14
- 81. Unemo M, Golparian D., Nicholas R., Ohnishi M., Gallay A., and Sednaoui P.** High-level céfixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel PenA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(3):1273-80
- 82. Vlad Grigorjev, Michelle J. Cole, Gianfranco Spiteri and al.** Is the tide again for cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Europe? Results from the 2013 European surveillance *BMC Infectious Diseases* (2015) 15: 321
- 83. Wade A.S., Lama range J., Mboup S. and al.** Reduction in risk-taking behaviors among MSM in Senegal between 2004 and 2007 and prevalence of HIV and others STIs. ELIHOS Project, ANRS 12139. *AIDS Care.* 2010; 22(4): 409-14
- 84. Warner DM., Shafer WM., Jerse AE. 2008** Les mutations cliniquement pertinentes qui provoquent un dé répression du système de pompage d'efflux *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE confèrent différents niveaux de résistance aux antimicrobiens et de condition physique in vivo. *Mol. Microbiol.* 70: 462-478.
- 85. X. Yang, Yong G, Tan J. and al.** Typing plasmid of high-level tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae* by PCR. *Chin J Microbiol. Immunol.*200626: 189-90.
- 86. Zafar Sultan, Shamsun Nahar, Bengt Wretlind and al.** Comparison of mismatch amplification mutation assay with DNA sequencing for characterization of fluoroquinolones resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. February 2004, p 591-594
- 87. Zhao L. H., Zhao S.P.** Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Shandon Province, China *Brazilian Journal of Microbiology,* 273-276 (2013)[Pub med]
- 88. Zhao Lihong and al.** Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and molecular characteristics of *N. gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ceftriaxone in Shandong, China, 2018journal home page: www.elsevier.com/locate/ijantimicag[Pub med]
- 89. Zheng and al.** The prevalence and epidemiology of plasmid-mediated penicillin and tetracycline resistance among *N. gonorrhoeae* isolates in Guangzhou China 2002-2012 *BMC infectious* (2015)15:412



Annexes

Annexe 1

Matériels de laboratoire (UBE)

- Le Quick-DNA Zymo Recherche
- Tubes PCR
- Cônes (10 μ l, 200 μ l et 1000 μ l)
- Des pipettes (eppendorfs)
- De l'eau distillée stérile
- Une étuve à température régulé (Memmert 840821)
- Une centrifugeuse (Sigma 50425)
- Une machine spectrophotomètre : le Nano Drop
- Eau RNase
- Un vortex (Bio block Scientific)
- Le master mix
- Le tampon réactionnel
- L'ADN polymérase
- De la poudre d'agarose
- Du tampon TAE
- Du bromure d'éthidium
- Du bleu de bromophénol
- Des marqueurs de masse moléculaire
- Des gants de nitrile
- Un vortex
- Une hotte
- Un réfrigérateur-congélateur
- Un congélateur
- Une balance Sartorius
- Un four micro-ondes
- Des Thermocycleur applied biosystème 2720
- Des systèmes d'électrophorèse horizontale
- Un générateur de courant
- Un Trans illuminateur à ultra-violet
- Lecteur de gel
- Des papiers aluminium

Annexe 2

Principe d'extraction d'ADN

Protocole d'extraction en 10 étapes

- 1.** Ajouter 750ul de solution de lyse (Tampon de lyse) dans la suspension bactérienne
- 2.** Bien sécuriser les tubes puis vortex au moins 10-15mn pour homogénéiser le mélange
- 3.** Centrifuger dans une mini centrifugeuse à 10.000 x g pour 1mn
- 4.** Transférer 400ul le surnageant dans les tubes Zymo-Spin™ IV Filtre (couvercles orange), puis mettre dans les tubes de collecte et centrifuger à 7.000 x g pour 1mn
Note : prenez soin de casser le terminal du filtre Zymo-Spin™ avant l'utilisation (priorité)
- 5.** Additionner 1.200ul de Tampon de lyse génomique Buffer dans le filtra des tubes de collectes comme celui du point 4(bien mélanger)
- 6.** Transférer 800ul du mélange du point 5 dans les tubes Zymo-Spin™ IIC colonnes dans un nouveau tube de collecte et centrifuger à 10.000 x g pour 1mn
- 7.** Jeter le tube de collecte avec l'écoulement et répéter la phase 6
- 8.** Ajouter 200ul de Tampon de Prélavage d'ADN à la colonne de Zymo-Spin™ IIC dans un nouveau tube de collecte et centrifuger à 10.000 x g pour 1mn
- 9.** Ajouter 500ul de Tampon de lavage g-ADN à la colonne Zymo-Spin™ IIC et centrifuge à 10.000 x g pour 1mn
- 10.** Transférer la colonne Zymo-Spin™ IIC vers un tube de micro centrifugeuse propre 1,5ml et ajouter 100ul (35ul au minimum) de Tampons d'Elution d'ADN Buffer directement dans la colonne de la matrice. Centrifuger à 10.000 x g pendant 30s pour éluer l'ADN. L'ADN ultra pure peut être utilisé pour des expériences à base moléculaire ou stocké $\leq -20^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation future ; faire un dépôt de gel.

Annexe 3 : Protocole Quantification microvolume des acides nucléiques en utilisant un Nano Drop Lite® 2000c Spectrophotomètre

1. Pour commencer, nettoyer les surfaces supérieures et inférieures optique du système de rétention spectrophotomètre microvolume échantillon par pipetage 2 à 3µl d'eau déminéralisée propre sur la surface inférieure optique.
2. Fermer le bras de levier, en s'assurant que le piédestal supérieur vient en contact avec l'eau déminéralisée. Soulever le bras de levier et essuyer les surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
3. Ouvrir le logiciel Nanodrop Lite ® et sélectionnez l'application des acides nucléiques. Utiliser un petit volume, pipette calibrée pour effectuer un essai à blanc en supprimant 1µl de tampon sur la surface inférieure optique. Abaisser le bras de levier et sélectionnez "vierge" dans l'application des acides nucléiques.
4. Une fois l'essai à blanc est terminé, nettoyer les deux surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
5. Choisissez la constante appropriée de l'échantillon qui doit être mesurée.
6. Repartir 1µl d'échantillon d'acides nucléiques sur la partie inférieure du piédestal optique et fermer le bras de levier. Parce que la mesure est indépendante du volume, l'échantillon a seulement besoin de combler le fossé entre les deux surfaces optiques pour une mesure à prendre.
7. Sélectionnez "mesure" dans le logiciel d'application. Le logiciel calcule automatiquement le taux de concentration d'acides nucléiques et de pureté.
8. Le logiciel calcul automatiquement le taux de concentration d'acides nucléiques et de pureté. Suite à la mesure de l'échantillon, l'examen de l'image spectrale pour évaluer la qualité de l'échantillon.

(Source : <https://www.jove.com/video/2565/nanodrop-microvolume>)

Annexe 4 : Préparation du tampon de migration

1. Préparation du tampon de migration TBE 10X

- Tris base.....108g
- EDTA.....9, 3g
- Acide borique.....55g
- Eau distillée qsp.....1000ml

Dissoudre, ajuster à Ph 8

Autoclaver 20mn à 110°C et conserver à la température du laboratoire

2. Préparation du tampon de migration TAE 50X

- Tris base.....242g
- Acide acétique glacial.....57, 1 ml
- EDTA0, 5 M, PH 8.....100ml
- Eau distillée qsp.....1000ml

Dissoudre, ajuster à Ph 8

Autoclaver 20mn à 110°C et conserver à la température du laboratoire

3. Préparation de gel à 1%

Peser 1g d'agarose

Ajouter 100ml de tampon de migration

Dissoudre et mettre au four micro-onde 1mn

Laisser refroidir environ 50°C ajouter 0,5mg/l

Couler le gel après avoir préparé la cuve et la plaque de migration

UBE/IPD

Résumé

Introduction : *N.g.* est un diplocoque à Gram négatif qui provoque une IST, la gonorrhoeae. Les β-lactamines, antibiotiques à large spectre, couramment utilisés dans le traitement des IST n'ont pas été épargnés par le phénomène de résistance chez *N.g.* Cette résistance est liée à des mutations et à la dissémination des gènes.

Objectif : L'objectif de cette étude rétro-prospective était de déterminer le profil de sensibilité et des déterminants génétiques de la résistance aux β-lactamines des souches de *N.g.* isolées au LBM de l'IPD.

Méthodologie : Quatre-vingt-six (86) souches de *N. g* ont constituées l'échantillonnage. Vingt-neuf isolats (29) ont été l'objet d'étude moléculaire. Les ADNs ont été extraits et amplifiés par la technique « PCR classique » à partir des amorces spécifiques des gènes recherchés *pilQ*, *ponA*, *blaTEM-1*, *porB*, *penA*, *mtrR* et *gyrA*. Les gènes de résistance ont été identifiés et révélés par électrophorèse sur gel agarose.

Résultats : L'étude de la sensibilité des souches de *gonocoques* aux antibiotiques n'a montré aucune résistante avec la céfotaxime, la spiramycine, l'érythromycine, la spectinomycine et la ceftriaxone. Les gènes *pilQ*, *ponA*, *TEM-1* et *porB* ont été détectés respectivement chez Cent pour cent (100%, 29/29), quatre-vingt-treize pour cent (93,1%, 27/29), quarante-huit pour cent (48,3%, 14/29) et quarante-un pour cent (41,3%, 12/29) des isolats. Le gène *gyrA* a été détecté chez Cent pour cent (100%, 29/29) des souches. Les gènes *mtrR* et *penA* n'ont pas été détectés.

Conclusion : La résistance aux β-lactam. et aux FQ de *Neisseria g.* à prélèvement urétral a augmenté au cours de ces dernières années. Les aminosides, les macrolides et les C3G restent encore des molécules de choix. La promotion de diagnostic moléculaire, d'alternatives thérapeutiques ainsi qu'une surveillance de l'usage des antimicrobiens sont indispensables pour contrôler la diffusion de la résistance aux β-lactamines et aux FQ chez *N.g.*

Mots clés : *N. g.* Résistance, β-lactamines, Fluoroquinolones, β-lactamase, C3G, PCR

Summary

Introduction: *N.g.* is a Gram-negative diplococcus that causes the STI, *gonorrhoeae*. β-lactam antibiotics, broad-spectrum antibiotics, commonly used in the treatment of STIs have not been spared by the phenomenon of resistance in *N.g.* This resistance is related to mutations and dissemination of genes.

Objective: The objective of this retrospective study was to determine the susceptibility profile and genetic determinants of β-lactam and Quinolone resistance in *N.g.* strains isolated at the Laboratory of Medical Biology of the Institute Pasteur in Dakar

Methodology: Eighty-six (86) strains of *N. g.* constituted the sampling. Twenty-nine isolates (29) were studied molecularly. The DNAs were extracted and amplified by the "classical PCR" technique from the specific primers of the desired genes *pilQ*, *ponA*, *blaTEM-1*, *porB*, *penA*, *mtrR* and *gyrA*. Resistance genes were identified and revealed by agarose gel electrophoresis

Results: The study of the susceptibility of gonococcal strains to antibiotics showed no resistance with céfotaxime, spiramycin, Erythromycin, spectinomycin and ceftriaxone. The *pilQ*, *ponA*, *TEM-1* and *porB* genes were detected in one hundred percent (100%, 29/29), ninety-three percent (93.1%, 27/29) and forty-eight percent, respectively. (48.3%, 14/29) and forty-one percent (41.3%, 12/29) isolates. The *gyrA* gene was detected in one hundred percent (100%, 29/29) strains. The *mtrR* and *penA* genes were not detected.

Conclusion: Resistance to β-lactam antibiotics and FQ from *N. g.* has increased in recent years. Amino glycosides, macrolides and C3Gs are still molecules of choice. The promotion of molecular diagnostics, therapeutic alternatives and antimicrobial use monitoring are essential to control the diffusion of β-lactam and FQ resistance in *N. g.*

Key words: *N. gonorrhoeae*, resistance, β-lactam, fluoroquinolones, β-lactamase, C3G, PCR