



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Résistance de *Neisseria gonorrhoeae* à la
tétracycline**

Présenté par : **DEKKAKI MOUNA**

Encadré par : **Pr El ABED SOUMYA (FST-Fès)**

Pr BENNANI BAHIA (FMP-Fès)

Soutenu le : 07/06/2018

Devant le jury composé de :

- **Pr El ABED SOUMYA**
- **Pr BENNANI BAHIA**
- **Pr IRAQUI MOHAMMED**

Stage effectué à : Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire-Faculté
de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2017-2018

Sommaire

| | |
|-------------------------------------|-----|
| <i>Dédicace</i> | i |
| <i>Remerciements</i> | ii |
| Résumé | iii |
| Liste des tableaux | iv |
| Liste des abréviations | v |
| Introduction | 1 |

Chapitre1: Synthèse bibliographique

| | |
|--|----|
| I. Généralités sur <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 2 |
| 1. Classification..... | 2 |
| 2. Structure de génome | 2 |
| 3. Pouvoir pathogène..... | 3 |
| 3.1. Généralités | 3 |
| 3.2. Facteurs de virulence | 3 |
| 3.3. Stratégie d'évasion du système immunitaire | 4 |
| 4. Infections gonococciques..... | 5 |
| 4.1 Chez la femme..... | 5 |
| 4.2 Chez l'homme | 5 |
| 4.3 Infections périnatales | 6 |
| 4.4 Infections chez les enfants..... | 6 |
| 4.5 Infections gonococciques disséminées..... | 6 |
| 5. Transmission..... | 7 |
| 6. Prévention | 7 |
| 7. Diagnostic..... | 7 |
| 8. Epidémiologie | 8 |
| II. Notion générales sur les différentes familles des antibiotiques | 8 |
| 1. Définition d'un antibiotique | 8 |
| 2. Classification des antibiotiques | 8 |
| 3. Mode d'action de quelques antibiotiques | 9 |
| III. Résistance bactérienne aux antibiotiques | 9 |
| 1. Définition de la résistance bactérienne | 9 |
| 2. Types de résistance..... | 10 |
| 2.1. Résistance intrinsèque..... | 10 |
| 2.2. Résistance acquise | 10 |
| 3. Mécanismes génétiques de la résistance acquise..... | 10 |

| | | |
|---|---|----|
| 3.1. | Résistance chromosomique..... | 10 |
| 3.2. | Résistance plasmidique | 11 |
| 3.3. | Types de mécanismes de résistance..... | 11 |
| IV. | Résistance aux antibiotiques chez <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 12 |
| 1. | Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>N. gonorrhoeae</i> | 12 |
| 2. | Résistance aux antibiotiques chez <i>N. gonorrhoeae</i> | 12 |
| 3. | Résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> à la tétracycline | 13 |
| Chapitre 2: Matériel et méthodes | | |
| 1. | Caractéristiques de la population étudiée | 14 |
| 2. | Extraction d'ADN par la lyse cellulaire | 14 |
| 3. | Purification d'ADN après la lyse cellulaire par la protéinase K..... | 15 |
| 4. | Réaction de polymérase en chaine | 15 |
| 5. | Electrophorèse | 17 |
| 5.1. | Préparation du gel d'agarose | 17 |
| 5.2. | Dépôt des produits d'amplification..... | 18 |
| 6. | Analyse statistique..... | 18 |
| Chapitre 3: Résultats et discussions | | |
| 1. | Prévalence de la tétracycline chez <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 21 |
| 2. | Corrélations entre la résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> à la tétracycline et les différents variables. | 22 |
| 2.1. | Corrélation de TRNG et le suivi de grossesse | 22 |
| 2.2. | Corrélation de TRNG en fonction du groupe d'âge..... | 22 |
| 2.3. | Corrélation entre le TRNG et le niveau d'étude..... | 23 |
| 2.4. | Corrélation entre le TRNG et le service de prélèvement | 24 |
| 2.5. | Corrélation entre le TRNG et le nombre d'enfant | 24 |
| Conclusion | | 26 |
| Référence | | 27 |
| Annexe | | 29 |

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et plus grand respect, car je ne pourrais jamais oublier la tendresse l'amour et respect dévoué par lesquels ils m'ont toujours entourer depuis mon enfance.

Mes sœurs

Khaoula et Soukaina, je vous dédie ce travail en témoignage des liens solides et intimes qui nous réunissent.

A mes très chères amies

*Nouha Merci pour m'avoir apporté l'aide dont j'avais besoin. Sache que tu m'as aidé bien plus que tu ne le penses alors je t'écris un « Merci » qui vient vraiment du fond du cœur.
Zineb Ce fut une période difficile et ton aide fut plus qu'appréciable. C'est si bon de savoir que tu étais présente à mes côtés. Sache que cette main tendue restera à jamais dans mon cœur.*

A tous le personnel de la faculté de médecine

Qui m'ont bien aidé à atteindre mon objectif (projet) au sein de votre honorable préfecture et nous Précisons le laboratoire de microbiologie de biologie moléculaire qui me garderais toujours leurs esprits et leur Grande valeur d'innovation.

Tous mes ami(e) s sans distinction :

A tous mes amis, et à tous ceux que j'aime et à toutes les personnes qui m'ont Prodigué des encouragements et se sont données la peine de me soutenir durant cette année.

Remerciements

Avant d'entamer ce présent rapport, je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères sentiments et remerciement à tous ceux qui ont participé de manière directe ou indirecte à l'élaboration de ce projet.

A cette occasion, je tiens à remercier profondément :

- Professeur *BENNANI BAHIA*, chef de laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire, qui a bien voulu m'accorder la possibilité de passer un stage de 6 semaines au sein de la faculté de médecine, et qui m'a bien encadré pendant toute la durée de stage, sans hésiter à aucun moment de me consacrer une part de son temps précieux, afin de m'aider considérablement dans la réalisation de mon projet, et qui m'a bien soutenu par ses conseils constructifs tout au long du stage.
- Professeur *EL ABED SOUMYA*, qui a accepté généreusement de m'orienter, et qui m'a permis d'avoir toutes les références et les renseignements possibles, pour bien accomplir mon stage dans les meilleures conditions.

J'adresse aussi cordiaux et mes sincères remerciement à :

- *Professeur IRAQUI MOUHAMMED* d'avoir acceptée de consacrer son temps pour l'évolution de mon travail.
- *Professeur HALOTI SAID*, et tous mes chers formateurs au sein du complexe, qui n'ont jamais hésité à m'encadrer ou à m'octroyer la main de soutien et d'assistance.
- *Mme KARIM SAFAE*, pour ses amabilités, ses orientations et ses disponibilités qui m'ont porté et pour les explications qui m'a donnée durant ce stage.
- je tiens finalement à féliciter toutes ces personnes pour leur bonne organisation, leurs actions conjuguées et leur meilleur savoir-faire pour offrir une main d'œuvre qualifiée.

Résumé

Cent quarante-neuf échantillons de *N.gonorrhoeae* prélevés des femmes consultant au service de gynécologie et au laboratoire d'anatomie au centre Hospitalier Universitaire HASSAN II, ont été évalués pour détecter leur résistance à la tétracycline en utilisant des approches moléculaires (PCR et électrophorèse sur gel d'agarose).

Durant cette étude, on a pu montrer que la prévalence de TRNG (pour les cent quarante-neuf échantillons analysés est de 46,3%). Cette résistance témoigne de la capacité de *N.gonorrhoeae* a développé une résistance à la tétracycline, soit en raison d'une mutation sélective, soit en raison de l'acquisition de mécanismes de résistance par transmission d'autres souches ou espèces. La corrélation entre TRNG et des facteurs de risques a été également évalué montrant ainsi que la prévalence pour le facteur âge (30-50 ans) et de 58%, niveau d'étude (analphabète 51,1%), et le suivi de grossesse [femmes enceintes=25,9% ; femmes non enceintes=50,8%].

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Mode d'action des antibiotiques | 9 |
| Tableau 2 : Types de mécanismes de résistance | 11 |
| Tableau 3 : Réactifs utilisés et leurs concentrations | 16 |
| Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour les études génotypiques | 16 |
| Tableau 5 : Protocole de cyclage thermique pour la PCR | 17 |
| Tableau 6 : Caractéristiques et prévalences de la population étudiée | 20 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Exemple de résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose | 21 |
| Figure 2 : Pourcentage de TRNG en fonction du suivi de grossesse | 22 |
| Figure 3 : Pourcentage de TRNG en fonction de groupe d'âge | 23 |
| Figure 4 : Pourcentage de TRNG en fonction du niveau d'étude | 24 |
| Figure 5 : Pourcentage de TRNG en fonction du service de prélèvement | 24 |
| Figure 6 : Pourcentage de TRNG en fonction du nombre d'enfant | 25 |

Liste des abréviations

CLSI : institut de normalisation de laboratoire clinique

CMI : concentration minimale inhibitrice

DGI : infection gonococcique disséminée

Los /LPS : les lipooligosaccharide/lipooligosaccharide

Mb : méga base = 1 million de paires de base

MST : maladies sexuellement transmissibles

Mtr : la résistance multiple transférable

N.gonorrhoeae : *Neisseria gonorrhoeae*

OMP : Protéines membranaires externes

OMS : Organisation mondiale de santé

Opa : les protéines d'opacité

PBP : Protéine de liaison à la pénicilline

PID : Les Pneumopathies Interstitielles Diffuses

Por : les porines

Rpm : rotation par minute

Ssp : sous espèces

TAAN : le test d'amplification de l'acide nucléique

TRNG : la résistance de *N.gonorrhoeae* à la tétracycline

Introduction

Neisseria gonorrhoeae est l'un des pathogènes les plus fréquents causant des maladies sexuellement transmissibles dans le monde entier, tel que la gonorrhée qui est la deuxième infection bactérienne sexuellement transmissible la plus répandue dans le monde. (Marrazzo 2017)

Selon l'évaluation de l'OMS, les infections gonococciques représentent 106 millions de quelque 499 millions de nouveaux cas d'IST curables qui surviennent chaque année dans le monde. (Horn et al. 2014)

Les humains sont les seuls hôtes et réservoirs connus pour *N. gonorrhoeae*. En tant que tel, le gonocoque a développé des mécanismes sophistiqués et redondants pour envahir avec succès l'hôte humain, persister dans les tissus humains et échapper à la réponse immunitaire humaine. Le gonocoque n'infecte pas naturellement d'autres animaux, ce qui demeure un obstacle important à la compréhension de son mode de vie in vivo. (McSheffrey and Gray-Owen 2014)

La résistance aux antimicrobiens chez *N. gonorrhoeae* est apparue peu de temps après l'introduction des antibiotiques dans la pratique clinique. De plus, sa capacité à acquérir et / ou à maintenir des gènes de résistance aux antibiotiques est devenue un problème considérable et un obstacle à un traitement thérapeutique efficace.

Au fil du temps, *N. gonorrhoeae* a progressivement développé une résistance à un large éventail d'antibiotique, y compris la pénicilline, la ciprofloxacine, la tétracycline, les macrolides, et plus récemment, aux céphalosporines de 3^{ème} génération, cette résistance est causée par le gène *mtr*, dont TRNG est associée à la présence d'un plasmide qui porte un déterminant de résistance à la tétracycline *TetM*. (Gianecini et al. 2015)

Au cours des dernières années, des cas d'échec du traitement dus à la résistance de *N.gonorrhoeae* aux céphalosporines ont suscité des inquiétudes, et une résistance à l'azithromycine a également été rapportée.

L'objectif de cette première étude au Maroc, est de réaliser une mise en point de la PCR pour étudier la résistance, ainsi que déterminer la prévalence de la résistance à la tétracycline chez *N. gonorrhoeae*.

I. Généralités sur *Neisseria gonorrhoeae*

1. Classification

Neisseria gonorrhoeae, forme un genre de bactéries à gram négatifs, immobiles qui se présentent sous forme diplocoques à face aplatie ou en tétrades, appartenant à la famille des *Neisseriaceae*. Cette dernière comprend le genre *Neisseria* ainsi que les genres hétérogènes (en ordre de parenté décroissante avec le genre *Neisseria*): *Kingella*, *Eikenella*, *Alysiella*, *Simonsiella*, *Microvirgula*, *Vogesella*, *Vitreoscilla*, *Chromobacterium*, *Aquaspirillum*, *Prolinoborus*, *Formivibrio* et *Iodobacter* (Jenkins et al. 2014).

En général, les espèces de *Neisseria* sont extrêmement bien adaptées à la vie dans leurs niches muqueuses. Cela a affaibli leur capacité biochimique, de sorte qu'il y a un nombre restreint de sources de carbone qu'ils peuvent métaboliser, et ils ont perdu la capacité de synthétiser les nutriments qui sont facilement disponibles dans les tissus infectés. Ces caractéristiques sont utilisées pour distinguer *N. gonorrhoeae* des autres espèces neissériennes. (McSheffrey and Gray-Owen 2014).

2. Structure de génome

La taille du chromosome de *Neisseria* est d'environ 2,2-2,3 Mb ainsi que sa teneur moyenne en G + C est de 48-56% molaire, C'est environ la moitié de la taille du génome de *E. coli*, ce qui reflète l'adaptation stricte de *N. gonorrhoeae* à la vie dans sa niche muqueuse. En raison de l'instabilité génétique, les sous espèces de *Neisseria* ont des génomes hyperdynamiques tel que *N. gonorrhoeae* ce qui lui confère l'adaptation et l'évasion immunitaire, et par conséquent au potentiel pathogène de gonocoque et au développement de lignées hypervirulentes. Cette adaptation a modifié les programmes génétiques de base dans la cellule. Le plus remarquable à cet égard est le contrôle altéré du «système SOS» prototypique, qui mobilise les voies de réparation et de recombinaison de l'ADN en réponse au stress environnemental (Jenkins et al. 2014 ; McSheffrey and Gray-Owen 2014).

Les sources les plus importantes d'instabilité génomique neissérienne sont les suivantes:

- la phase de variation : expression variable de la protéine due à un mésappariement de brins de séquences de nucléotides trouvés dans ou à proximité de la région promotrice, ou dans des cadres de lectures ouverts (Jenkins et al. 2014).

- la phase de recombinaison : l'échange génétique ou le réarrangement de l'ADN provenant de sources externes ou internes (*Jenkins et al.2014*).
- le transfert de gènes horizontal : l'introduction de gènes principalement par une transformation naturelle, et l'intégration dans le chromosome par recombinaison homologue médiée par *RecA* (*Jenkins et al.2014*).
- Hypermutation : augmentation des taux de mutation globaux, cette augmentation est souvent associée à des déficiences de réparation de l'ADN, à une infidélité de réplication ou à une surexpression de l'ADN polymérase de translation (*Jenkins et al.2014*).

3. Pouvoir pathogène

3.1.Généralités

Traditionnellement, les gonocoques se différencient des autres *Neisseria* par leur capacité à croître sur des milieux sélectifs, ils utilisent du glucose mais pas du maltose, du saccharose ou du lactose, ils réduisent les nitrites, et par l'incapacité de bien se développer à température réduite ou sur simple gélose nutritive.

Les composants de surface du gonocoque tels que les pili de type VI, les OPA, LOS et les porines ont été liés à l'adhérence, la pénétration tissulaire et cellulaire, la cytotoxicité et l'évasion des défenses systémiques de l'hôte et à la muqueuse (*Marrazzo 2017*).

Premièrement, la bactérie doit adhérer à la surface de la muqueuse. Le gonocoque est ensuite englouti dans un phagosome enfermé dans la membrane qui est déplacé activement à travers la barrière épithéliale, puis libéré dans l'espace sous-épithélial. Après avoir pénétré dans l'espace sous-épithélial, *N. gonorrhoeae* doit persister dans les tissus, en acquérant les nutriments essentiels au niveau de l'hôte. Dans des rares cas, le gonocoque peut quitter le site de l'infection initial, pénétrer dans la circulation sanguine et provoquer une infection gonococcique disséminée (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

3.2. Facteurs de virulence

Lipopolysaccharide : LPS a une activité endotoxine, ce dernier est libéré sous forme de vésicules de la membrane externe bactérienne ou par la lyse cellulaire. Le LOS est responsable des dommages toxiques sur les tissus humains, du développement du choc septique et de la coagulation intravasculaire disséminée par des interactions avec les récepteurs Toll-Like (TLR4) et l'induction des cytokines (*Jenkins et al. 2014*).

Pili de type IV : adhésines majeures ou des filaments flexibles solides s'étendant à partir de la surface des cellules gonococcique qui facilitent l'attachement initial aux cellules humains non ciliés, ainsi qu'une seule souche de *N. gonorrhoeae* est capable de produire des pili avec des compositions antigénique différents et a également une rôle nécessaire pour une transformation efficace de l'ADN (*Jenkins et al. 2014 ;Marrazzo 2017*).

Protéines membranaires externes : sont des antigènes dominants.

-Les Por : ce sont des protéines qui favorisent la survie intracellulaire Les variations de la séquence Por ou des types antigéniques forment la base pour les systèmes de typage gonococcique les plus couramment utilisés (*Marrazzo 2017*).

la variation antigénique fréquente rend la reconnaissance des antigènes protéiques de la porine par le système immunitaire de l'hôte difficile (*Jenkins et al. 2014*).

-les OPA : médient et fortifient l'attachement aux cellules eucaryotes.

Protéines liant le fer : ce sont des protéines de liaison à la transferrine, à la lactoferrine et à l'hémoglobine. La pathogénicité des ssp de *Neisseria* dépendent d'un approvisionnement en fer constant pour la croissance (*Jenkins et al. 2014*).

Protéase IgA1 : détruit les IgA muqueuses qui font partie du système immunitaire local.

β -Lactamase : une enzyme qui hydrolyse l'anneau β -lactame de la pénicilline , ainsi qu'elle joue un rôle important pour la résistance aux antibiotiques (*Jenkins et al. 2014*).

3.3. Stratégie d'évasion du système immunitaire

La propension unique de *N. gonorrhoeae* à persister dans l'espace sous-épithélial offre l'avantage qu'il est baigné dans les nutriments, mais il est évident que les bactéries doivent surmonter les mécanismes immunitaires innés et adaptatifs efficaces, pour empêcher l'entrée microbienne dans ces tissus autrement stériles. Bien que la capacité de ces bactéries à altérer les antigènes de surface permet au gonocoque d'échapper aux réponses adaptatives simples à l'infection, évitant ainsi la détection par des anticorps développés lors d'infections antérieures ou postérieures. Le système immunitaire humain protège contre les microbes envahissants. La persistance de *N. gonorrhoeae*, à la fois dans la population et chez chaque individu infecté, reflète donc une capacité impressionnante à éviter, supprimer et / ou subvertir chacune de ces défenses (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

4. Infections gonococciques

4.1 Chez la femme

Premièrement, *N. gonorrhoeae* colonise et infecte les cellules épithéliales cylindriques de l'endocol, d'ailleurs La croissance gonococcique est arrêtée dans des conditions de culture acides, et puisque les femmes infectées par *N. gonorrhoeae* ont tendance à avoir un pH vaginal plus élevé, ce qui suggère qu'un faible pH vaginal peut protéger cette muqueuse. La propagation gonococcique de l'endocol dans le tractus génital supérieur déclenche une maladie plus grave. On estime que *N. gonorrhoeae* remontera du col de l'utérus dans l'utérus autrement stérile ou les trompes de Fallope chez jusqu'à 45% des femmes non traitées, avec la possibilité de provoquer une salpingite. Si rien n'est fait, cette inflammation peut causer des cicatrices et des blocages dans les trompes de Fallope, ce qui augmente le risque de grossesses extra-utérines et d'infertilité. Les infections symptomatiques peuvent se manifester par une dysurie, des pertes vaginales et des saignements vaginaux anormaux (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

4.2 Chez l'homme

L'infection génitale des mâles entraîne généralement une urétrite aiguë, dont les symptômes prédominants sont la dysurie et un exsudat purulent caractérisé par la prédominance des neutrophiles polynucléaires (PMN) avec les gonocoques englobés (intracellulaires). Une épидидymite unilatérale sans écoulement peut également être présente (*McSheffrey and Gray-Owen 2014 ; Mayor, Roett, and Uduhiri 2012*).

Les hommes atteints de gonorrhée sont habituellement symptomatiques, mais des infections urétrales asymptomatiques peuvent survenir dans au moins 10% des cas. Lorsque les symptômes apparaissent, ils apparaissent généralement deux à cinq jours après l'infection, mais peuvent prendre jusqu'à 30 jours avant d'apparaître (*Mayor, Roett, and Uduhiri 2012*). Cela est assuré par l'examen microscopique des exsudats urétraux d'infections naturelles dans lesquelles les gonocoques ont été observés à l'intérieur des neutrophiles, qui détruisent probablement les bactéries, et les cellules épithéliales (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*). L'infection à *N. gonorrhoeae* monte rarement dans le tractus génito-urinaire masculin et provoque une épидидymite, une orchite et une stérilité, ou une progression vers une infection disséminée (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

4.3 Infections périnatales

L'infection périnatale est généralement acquise lors du passage à travers un canal de naissance infecté, bien que la transmission puisse se produire après la césarienne, en particulier après une rupture prématurée des membranes. Les risques pour l'infection chez les nourrissons comprennent le manque de prophylaxie ophtalmologique appropriée, le manque de soins prénataux chez la mère et d'abus de substances chez la mère (*Hsu and Wangu, n.d.*).

-Ophtalmie néonatale

La période d'incubation habituelle pour l'ophtalmie gonococcique du nouveau-né est de 2 à 5 jours, mais peut survenir plusieurs heures après la naissance (après une rupture prolongée des membranes) ou plusieurs semaines. La prématurité et la rupture prématurée des membranes sont des facteurs de risque importants pour l'ophtalmie gonococcique. Le moment de l'apparition, les résultats cliniques ne permettent pas de distinguer de façon fiable la conjonctivite à *N. gonorrhoeae* de la conjonctivite à *Chlamydia trachomatis* (*Hsu and Wangu, 2018.*)

Les signes typiques de la conjonctivite gonococcique sont un œdème bilatéral marqué de la paupière, une chémosse et une décharge purulente abondante. Bien que la conjonctivite gonococcique soit généralement moins sévère chez le nouveau-né que chez l'adulte, les complications cornéennes, comme l'ulcération et la perforation du globe (rarement), la panophtalmie, la cécité peuvent aussi survenir (*Hsu and Wangu, 2018.*)

4.4 Infections chez les enfants

Chez les enfants préadolescents, l'infection gonococcique est probablement révélatrice d'abus sexuels. La vaginite est le symptôme prépondérant chez les filles préadolescentes. Bien que les infections pharyngées et rectales peuvent coexister avec la vaginite, mais elles sont souvent asymptomatique. Si la gonorrhée est suspectée, la co-infection VIH, chlamydia et syphilis devraient être évaluées (*Mayor, Roett, and Uduhiri 2012.*)

4.5 Infections gonococciques disséminées

L'infection gonococcique disséminée est une complication rare de l'infection par *N. gonorrhoeae*. Entre 0,1 et 3% des infections à *N. gonorrhoeae* passeront à la DGI. Cependant, ce taux est difficile à estimer, tant qu'il est rare que les patients atteints de DGI présentent des symptômes génito-urinaires et inversement, parce que ceux présentant ces symptômes ont tendance à être traités avant que l'infection progresse vers la DGI (*McSheffrey and Gray-Owen 2014.*)

Les personnes atteintes de DGI présentent une combinaison de ténosynovite, de dermatite, de

polyarthralgie et d'arthrite purulente. Les individus peuvent également avoir de la fièvre, des frissons et un malaise général. Les femmes sont trois fois plus susceptibles de développer des DGI que les hommes, elles développent plus souvent des symptômes au cours des règles ou au cours des derniers stades de la grossesse (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

5. Transmission

Neisseria gonorrhoeae se transmet généralement par contact sexuel ou verticalement de la mère à l'enfant pendant l'accouchement. Dans les études de transmission pendant les rapports vaginaux, la gonorrhée semble se propager plus efficacement de mâle à femelle (probabilité de transmission de 50-73%, apparemment indépendante du nombre d'expositions) que de femme à homme (25-50% probabilité de transmission par exposition) (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*)

6. Prévention

Les préservatifs offrent un haut degré de protection contre l'acquisition de la gonorrhée, ainsi que contre d'autres maladies sexuellement transmissibles. D'autres mesures préventives ont mis en évidence tels que le diagnostic et le traitement précoces, la notification et le dépistage des partenaires. L'une des préventions consiste à utiliser les microbicides topiques comme protection intravaginale et intrarectale. Le degré de variabilité antigénique des pili, OMP et LOS au cours de l'évolution naturelle de l'infection a empêché les essais de développement d'un vaccin gonococcique (*Jenkins et al. 2014*).

7. Diagnostic

Classiquement, la gonorrhée a été diagnostiquée à la base d'un examen microscopique par coloration de Gram, préparées à partir de l'écouvillon d'un exsudat. Mais vu que la culture de *N.gonorrhoeae* est délicate, parce qu'il ne cultive pas sur des milieux ordinaires mais des milieux enrichis en substances organiques, ainsi qu'il nécessite une atmosphère aérobie stricte et enrichis en CO₂, donc une réaction PCR est mise en place (*Céline ACKER MEDETE 2010*).

La méthode la plus couramment utilisée pour le diagnostic dans les cliniques modernes est le test d'amplification de l'acide nucléique. Bien qu'ils existent plusieurs méthodologies différentes, ces tests détectent la présence d'ADN gonococcique ou d'ARN dans des échantillons allant de l'urine aux écouvillons des sites génitaux et extra génitaux. Le TAAN présente l'avantage d'être très sensible, spécifique et rapide, fournissant des résultats définitifs en quelques heures. Le principal inconvénient de l'utilisation de ces approches est qu'elles ne permettent pas la récupération des bactéries infectantes (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

8. Epidémiologie

La gonorrhée est une maladie sexuellement transmissible commune dans le monde entier. Aux états unis, l'infection à *N. gonorrhoeae* est la deuxième maladie à déclaration obligatoire avec 333 004 cas signalés en 2013. Les incidences en Europe et dans les pays en développement sont respectivement de 10-30 et 4000-10 000 pour 100 000 habitants. Dans les régions où les statistiques recueillies comprennent l'orientation sexuelle, les taux d'infections gonococciques ont plus que quadruplé entre 1995 et 2013 chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes. Le risque de contracter une infection urétrale chez les hommes est d'environ 20% après une seule exposition vaginale chez une femme infectée, atteignant 60 à 80% après quatre expositions ou plus. Bien que les gonocoques puissent survivre pendant de brèves périodes à l'extérieur du réservoir humain, la transmission extracorporelle est extrêmement rare. Le principal réservoir de propagation continue de la gonorrhée est le patient asymptomatique. Parmi les femmes infectées, 30 à 50% sont asymptomatiques ou ne présentent aucun symptôme associé à une maladie sexuellement transmissible. Parmi les hommes infectés, 5 à 10% seulement sont asymptomatiques. La maintenance et la transmission de la gonorrhée sont également liées à un sous-ensemble social de «transmetteurs de base» qui ont des relations sexuelles non protégées avec plusieurs nouveaux partenaires et qui sont soit asymptomatiques, soit choisissent d'ignorer les symptômes (*Jenkins et al. 2014*).

II. Notion générales sur les différentes familles des antibiotiques

1. Définition d'un antibiotique

Les antibiotiques sont des molécules qui tuent ou arrêtent la croissance des micro-organismes, y compris les bactéries et les champignons. (*Mandell,, 2009.*)

Les antibiotiques qui tuent les bactéries sont appelés "bactéricides" ,et les antibiotiques qui arrêtent la croissance des bactéries sont appelées "bactériostatiques". (*Mandell,, 2009.*)

2. Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs façons de classer les antibiotiques, mais les schémas de classification les plus courants reposent sur leurs structures moléculaires, mode d'action, et le spectre d'activité. D'autres incluent les voies d'administration également (*Etebu and Arikekpar 2016*).

3. Mode d'action de quelques antibiotiques

Tableau 1 : Mode d'action de quelques antibiotiques

| Antibiotique | Mode d'action |
|-----------------------|--|
| Pénicilline | un bactéricide qui réagit après sa liaison au PBP de la paroi bactérienne, pour pouvoir la détruire et inhiber sa synthèse.(David N, 2013) |
| Tétracycline | un bactériostatique qui, en se liant au ribosome bactérien, arrête la prolifération bactérienne, et inhibe la synthèse des protéines.(David N, 2013.) |
| Céphalosporine | un bactéricide, qui inhibe la synthèse de la paroi bactérienne, pour pouvoir la détruire (David N,2013.) |
| Sulfamide | un bactériostatique, qui en interférant avec la cascade de synthèse de l'acide folique, il arrête la prolifération bactérienne (David N,2013.) |
| Ciprofloxacine | inhibition de l'ADN gyrase (Lebel and Pharm, 1988.) |
| Spectinomycine | inhibiteurs de la synthèse des protéines 30S (Etebu and Arikekpar 2016) |
| Azithromycine | en altérant le cycle d'élongation de la chaîne peptidique en se liant spécifiquement à la sous unité 50S du ribosome, il inhibe la synthèse des protéines (Class, Spectrum, and Effects, 2016) |
| Céfixime | Est un bactéricide, qui s'interfère avec la synthèse de la paroi bactérienne et inhibe la réticulation du peptidoglycane (Cephalosporin,2016.) |

III. Résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Définition de la résistance bactérienne

suite à la pression de sélection antibiotique, sur le plan biochimique et génétique, les bactéries ont développé de nombreux mécanismes contribuant une résistance à la bactérie hôte et la capacité de transmission à d'autres bactéries (Courvalin 2008).

2. Types de résistance

2.1. Résistance intrinsèque

Les bactéries peuvent être intrinsèquement résistantes à un antimicrobien. La résistance est dite intrinsèque est un caractère qui touche toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle a pour rôle de délimiter le spectre d'action des antibiotiques. Cette résistance passive est une conséquence de processus adaptatifs généraux qui ne sont pas nécessairement liés à une classe d'antimicrobiens donnée (*Courvalin 2008*);(*Dzidic, Suskovic, and Kos 2008*).

2.2. Résistance acquise

La résistance acquise est présente chez certaines souches de la même espèce ou du même genre, dans certains cas elle peut concerner la grande majorité de ces souches. Le mécanisme majeur de la résistance aux antibiotiques, est le résultat d'une pression évolutive spécifique, qui a pour but de développer un certain mécanisme de contre-attaque contre un antimicrobien ou une classe d'antibiotique. Ce mécanisme a permis aux populations bactériennes précédemment sensible aux antimicrobiens deviennent résistantes. (*Courvalin 2008*);(*Dzidic, Suskovic, and Kos 2008*).

3. Mécanismes génétiques de la résistance acquise

Les bactéries ont une plasticité génétique remarquable, permettant de répondre aux menaces environnementales, y compris la présence de molécules antibiotiques qui pourraient compromettre leur existence. Les bactéries partageant la même niche écologique avec les organismes producteurs d'antimicrobiens ont développé des mécanismes anciens pour résister à l'effet de la molécule antibiotique nuisible, et par conséquent leur résistance intrinsèque leur permet de prospérer en sa présence.

les bactéries utilisent deux stratégies génétiques majeures pour s'adapter à l'attaque antibiotique, soit par mutations du gène souvent associées au mécanisme d'action du composé (résistance chromosomique), soit par acquisition d'ADN étranger codant pour des déterminants résistants à travers le transfert horizontal (*Johnson 2001*).

3.1. Résistance chromosomique

La résistance chromosomique est due en général à une mutation de gènes au niveau de différents locus chromosomiques, ces mutations sont rares. Ces dernières se produisent toutes les 10^5 à 10^{10} divisions, mais puisqu'il y a beaucoup de bactéries dans le milieu infectieux, il ne faut pas

négliger la probabilité qu'une bactérie résistante se développe. (*“Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines,” n.d.*)

3.2. Résistance plasmidique

La résistance plasmidique s'effectue par une molécule d'ADN qui ne se trouve pas dans tous les chromosomes, elle n'est pas indispensable à la survie de l'espèce, ainsi qu'elle possède la capacité d'autoréplication, cette molécule est dite plasmide. Ce dernier donne aux bactéries certains avantages dont la résistance aux antibiotiques.

Ce type de résistance est fréquent, puisqu'elle est liée à la synthèse des protéines additionnelles et non à une mutation. (*“Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines,” n.d.*)

3.3. Types de mécanismes de résistance

Tableau 2 : Types de mécanismes de résistance

| Types de mécanisme | Définition |
|--|--|
| la modification de l'antibiotique | la production d'un certain type d'enzyme par des souches résistantes, qui modifie la molécule et la rend inactive. (<i>“Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines,” n.d.</i>) |
| la réduction de la perméabilité membranaire | Concerne les bactéries à Gram négatif, parce que leur paroi protège la bactérie, cette mutation qui affecte la structure des porines ou diminue leur synthèse empêche l'antibiotique de pénétrer. (<i>“Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines,” n.d.</i>) |
| L'efflux actif | la capacité des bactéries d'éliminer l'antibiotique par pompage actif hors de la cellule, le rôle de ce dernier est de garder l'équilibre en évitant l'accumulation des substances toxiques dans le milieu intracellulaire. (<i>“Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines,” n.d.</i>) |
| La mutation de la cible de l'antibiotique | La modification du lieu de fixation d'antibiotique suite à une mutation au niveau du site de fixation empêchant la liaison d'antibiotique. (<i>“Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines,” n.d.</i>) |

IV. Résistance aux antibiotiques chez *Neisseria gonorrhoeae*

1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae possède des mécanismes de résistance différentes aux agents antimicrobiens, dont certains sont spécifiques aux groupes antibiotiques, tels que les mutations de gènes *gyrA* ou *parC* responsables de l'acquisition de la résistance aux quinolones, ou la présence de *TetM*, qui est capable de protéger le ribosome contre l'activité des tétracyclines.

D'autres mécanismes ont été décrits, tels que les pompes à flux et d'efflux qui peuvent affecter un large spectre d'agents. Parmi ceux-ci, le mieux caractérisé chez *N. gonorrhoeae* est de loin le système d'effluents McrCDE. Certaines études ont proposé que cette pompe efflux puisse induire une augmentation des niveaux de résistance à l'érythromycine, à l'ampicilline, à la tétracycline, ainsi qu'à d'autres produits antibactériens et toxiques (Ruiz et al. 2005)

2. Résistance aux antibiotiques chez *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae est connu par sa capacité remarquable à développer une résistance aux antibiotiques. Le gonocoque possède une résistance naturelle aux antimicrobiens tels que la vancomycine, la colistine et la triméthoprim.

Dans le passé, *N. gonorrhoeae* a développé rapidement une résistance à la plupart des antibiotiques qui ont été mis en place pour traiter l'infection. La résistance aux sulfanilamides a été signalée dès les années 1940, la résistance aux pénicillines et aux tétracyclines a été signalée dans les années 1980. Dans chaque cas, l'émergence de la résistance des isolats gonococciques s'est rapidement répandue au niveau international, de sorte que ces antibiotiques ont été retirés des traitements de routine.

Actuellement, les céphalosporines de troisième génération sont les antibiotiques recommandés pour traiter les infections gonococciques. Une dose unique de céfixime, administrée par voie orale, ou une dose unique de ceftriaxone, administrée par injection intramusculaire, sont les agents thérapeutiques recommandés.

Ceux-ci sont souvent complétés par 1 semaine de traitement avec l'azithromycine, qui a une activité contre *N. gonorrhoeae*.

Malheureusement, le taux d'échec du traitement par le céfixime augmente maintenant. Dans une étude, le taux global d'échec du traitement pour les infections gonococciques, y compris les

infections génitales, rectales et pharyngées, était de 6,77%. Plus précisément, des isolats gonococciques ayant CMI de céfixime supérieure à 0,12 µg / ml ont été associés à un taux d'échec du traitement de 25%. En raison de ces données, la ceftriaxone intramusculaire est devenue un traitement de choix pour la gonorrhée. Dans les cas où le céfixime est utilisé, un test de guérison est recommandé 1 semaine après le traitement pour détecter les échecs du traitement (*McSheffrey and Gray-Owen 2014*).

3. Résistance de *N. gonorrhoeae* à la tétracycline

En 1950, la tétracycline était un traitement pour *N. gonorrhoeae* dans le cas des patients allergique à la pénicilline. Cet agent antimicrobien affecte la synthèse des protéines en se liant à la sous-unité ribosomale 30S. Depuis l'introduction du traitement par la tétracycline, des souches de *N. gonorrhoeae* présentant des taux de résistance accrus (CMI de 0,5 à 4,0 µg / ml) ont été isolées. Cette résistance accrue à la tétracycline est due aux effets additifs de plusieurs loci chromosomiques appelés *TetM*, *mtr* et *penB* (*Costa-Lourenço et al. 2017*).

La protéine *TetM* a été identifiée comme le mécanisme responsable du phénotype de résistance, protégeant le ribosome de la liaison à la tétracycline. Dans *N.gonorrhoeae* *TetM* est porté par deux plasmides conjugatif, de taille similaire, mais probablement sans rapport avec l'évolution. Les motifs de fragments de restriction d'endonucléase des deux plasmides présentent des différences importantes, et même les séquences du *TetM* codé respectif ne sont pas identiques, mais les différences majeures entre ces plasmides étaient dans les locus impliqués dans la stabilité plasmidique. Ces plasmides peuvent se propager rapidement à travers les populations gonococciques (*Costa-Lourenço et al. 2017*).

1. Caractéristiques de la population étudiée

L'étude a été portée sur cent quarante-neufs *N.gonorrhoeae* détectés chez des femmes qui ont consulté le service de gynécologie et le laboratoire d'anatomie au centre Hospitalier Hassan II de Fès. Ces souches ont été évaluées en utilisant une réaction en chaîne par polymérase pour la détection du gène responsable de la résistance à la tétracycline (*TetM*).

- La population se compose de 149 femmes, dont 27 sont enceintes, et 122 sont non enceintes.
- L'âge des femmes étudiées est compris entre 20 et 66 ans avec un moyen d'âge de 43,13 ans. La plupart des femmes sont analphabètes (61,1%) et mariée (90,6%). Parmi elles, 60,4% ont eu plus de trois grossesses et près de 67,1% d'entre elles ont eu plus de trois enfants.
- La majorité des patientes (60,4%) ont été prélevées au laboratoire d'anatomie.

2. Extraction d'ADN par la lyse cellulaire

L'extraction de l'ADN par lyse cellulaire est une technique qui permet d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Cette technique consiste éventuellement en un broyage, suivi d'une extraction par des détergents, qui vont briser les membranes cellulaires et nucléaires et dénaturer les protéines.

L'extraction d'ADN des 149 échantillons par la lyse cellulaire est réalisée selon le protocole suivant : (*Bennani et al. 2012*)

- Centrifuger à 13000 rotations par minute pendant 15 minutes
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 120µl de PBS (1X) au culot (Annexe 1-a)
- Ajouter 40µl de la solution de lyse et protéinase K. (Annexe 1-b)
- Vortexer
- Incuber à 37°C pendant une nuit.
- Mettre en bain sec à 93°C pendant 10min pour la désactivation de la protéinase K.

3. Purification d'ADN après la lyse cellulaire par la protéinase K

Cette étape consiste sur la séparation de l'ADN de toutes les impuretés présentes dans le lysat tel que les protéines, les lipides, les polysaccharides qui empêchent les réactions enzymatiques. Cette séparation s'effectue par plusieurs méthodes, dont la technique de séparation par solvant organique. Puisque les ADN sont des molécules chargés négativement, ils sont insolubles dans les solvants organiques hydrophobes et solubles dans les solutions aqueuses hydrophiles.

La Purification d'ADN des 149 échantillons après la lyse cellulaire par la protéinase K est réalisée selon le protocole ci-après (*Bennani et al. 2012*):

- Ajouter 1 volume de phénol chloroforme en mélangeant tout doucement.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante.
- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube.
- Ajouter 0,1 volume de l'acétate de sodium 3M (Annexe 2)
- Ajouter 2 volumes d'éthanol 100%.
- Incuber à température ambiante ou au réfrigérateur pendant la nuit.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 20 minutes puis on élimine le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 2 minutes.
- Éliminer le surnageant
- Laisser sécher à température ambiante pendant 15 minutes.
- Suspendre dans le TE (1X). (Annexe 2-b)

4. Réaction de polymérase en chaîne

La PCR fut inventée par K.Mullis en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase thermostable, il s'agit d'une réplification in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel)

Cette technique est constitué de plusieurs cycles, et chaque cycle est constitué de trois étapes, qui se répète un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. En commençant tout d'abord par une étape de dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C pour séparer les deux brins qui le composent, suivit d'une étape d'hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée à une température compris

entre 54°C et 64°C, terminant par une étape d'élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase à 72°C.

La réaction de polymérase en chaîne consiste à préparer un mélange réactionnel appelé mix, destiné à la PCR est préparé dans un volume total de 20µl dans un tube eppendorffs juste avant l'emploi. Les réactifs utilisés ainsi que leurs concentrations sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3: Réactifs utilisés et leurs concentrations (Lawung et al. 2009)

| Les réactifs | Volume final (µl) | Concentration finale |
|------------------------|-------------------|----------------------|
| Tampon | 2 | 1 X |
| MgCl ₂ | 1,2 | 1,5 mM |
| dNTP | 1 | 200µM |
| TetM F | 0,2 | 30pM |
| TetM R | 0,2 | 30pM |
| La taq polymérase | 0,2 | 1 U |
| H ₂ O | 10,7 | - |
| ADN extrait et purifié | 5 | - |
| Le volume final | 20 | - |

Les amorces utilisées pour l'étude génotypique sont présentés dans le tableau 4, elles sont des amorces universelles :

Tableau 4 : séquences des amorces utilisées pour l'étude génotypique

| Gène ciblé | Amorce | Séquence | référence |
|-------------|--------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>TetM</i> | <i>TetMF</i> | 5'ACTGTTGAACCGAGYAAACCT3' | (Lawung et al. 2009) |
| | <i>TetMR</i> | 5'TCTATCCGACTATTTGGACGACG3' | |

Amplification :

L'amplification de l'extrait d'ADN est réalisée dans un thermocycleur scientifique. Le programme est donné par le tableau 6 :

Tableau 5: le protocole de cyclage thermique pour la PCR

| | Température | Durée |
|-----------------------|-------------|--------|
| Dénaturation initiale | 94°C | 5 min |
| Dénaturation | 94°C | 30 s |
| 35 cycles | Hybridation | 59°C |
| | Elongation | 72°C |
| Elongation finale | 72°C | 10 min |

Les produits amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

5. Electrophorèse

L'électrophorèse est une technique séparative. Le principe de cette technique consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respectivement : les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. En fonction de la charge, la masse, la forme, la nature du support et des conditions physico-chimiques, la vitesse de migration va être variable, ce qui favorise la séparation des différentes molécules.

5.1. Préparation du gel d'agarose

Une solution d'agarose à 1,5% est préparée dans un TBE 1 X selon le protocole ci-après.

- Peser précisément 1,5 g d'agarose dans un erlenmeyer taré.
- Préparer une solution de TBE (1X) à partir d'une solution mère concentrée 10X. (Annexe 3-a)
- Mesurer 100 ml de TBE (1X) dans une éprouvette. (Annexe 3-b)
- Ajouter le TBE (1X) à l'agarose et chauffer (micro-onde ou plaque chauffante) de sorte à dissoudre totalement l'agarose.

Après chauffage jusqu'à dissolution complète et refroidissement à 60°C, on ajoute le bromure d'éthidium à raison de (0,5µg/ml). Ensuite, le gel est coulé dans un moule muni d'un peigne à 6 ou 12 puits. Le gel doit être submergé dans son intégrité. Après polymérisation, le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse et immergé dans une solution de TBE 1X.

5.2. Dépôt des produits d'amplification

Afin de suivre la migration d'un produit d'amplification dans le gel d'agarose, 9 µl de ce produit est mélangé à 2 µl d'une solution de charge avant de le déposer dans les puits de gel. La solution de charge contient essentiellement :

Un marqueur de mobilité : bleu de bromophénol (2,5 µl/ml) qui permet de suivre la migration. (Annexe 3-d)

Un alourdisseur «glycérol» (300 µl/ml) pour entrainer l'ADN au fond des puits.

Migration et visualisation

La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 70 Volts pendant 5 min, pour permettre la sortie de l'ADN des puits. Ensuite le voltage est réglé à 50 volts durant le reste d'électrophorèse. Celle-ci est arrêtée lorsque le témoin de migration (bleu de bromophénol) atteint les trois-quarts de la longueur du gel.

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'Ethidium (BET). Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques. Le gel est visualisé à l'aide d'un transilluminateur à UV puis photographié.

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée par logiciel EPI info pour étudier les différentes corrélations entre la résistance de *N. gonorrhoeae* à tétracycline et les différentes variables.

La gonorrhée reste l'une des infections sexuellement transmissibles (IST) les plus courantes dans les pays en développement (Lawung et al. 2012). La résistance de *N.gonorrhoeae* à la tétracycline est bien connue et a augmenté au fil des années. Les *N.gonorrhoeae* résistants à la tétracycline à médiation plasmique de haut niveau ont été observés pour la première fois aux Etats-Unis en 1985 et se sont répandus dans le monde.(Ieven et al. 2003). Les taux élevés de résistance à la tétracycline peuvent être liés à plusieurs facteurs y compris l'âge, le niveau d'étude etc.

Les caractéristiques et les prévalences de la population étudiée sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques et prévalence de la population étudiée

| Variable | Catégorie | Effectif | Fréquence (%) |
|---|-------------------------------|----------|---------------|
| Groupe d'âge N=148 | 30 ans | 22 | 14,8 |
| | 30-50 ans | 83 | 55,7 |
| | 50 ans | 43 | 28,9 |
| Niveau d'étude N=148 | Analphabète | 91 | 61,1 |
| | Niveau primaire | 24 | 16,1 |
| | Niveau secondaire | 17 | 11,4 |
| | Niveau universitaire | 16 | 10,7 |
| L'état familial N=149 | Célibataire | 2 | 1,3 |
| | Divorcée | 4 | 2,7 |
| | Mariée | 135 | 90,6 |
| | Veuve | 8 | 5,4 |
| Nombre de grossesses N=145 | Nombre de grossesses ≤ 3 | 90 | 60,4 |
| | Nombre de grossesses > 3 | 55 | 36,9 |
| Nombre d'enfants N=145 | Nombre d'enfants ≤ 3 | 100 | 67,1 |
| | Nombre d'enfants > 3 | 45 | 30,2 |
| Fausse couche N=148 | Non | 103 | 69,1 |
| | Oui | 45 | 30,2 |
| Ménopause N=145 | Non | 91 | 61,1 |
| | Oui | 54 | 36,2 |
| Antécédents des lésions N=145 | Non | 113 | 75,8 |
| | Oui | 32 | 21,5 |
| Suivi de grossesse N=149 | Non | 122 | 81,8 |
| | Oui | 27 | 18,12 |
| Le service de prélèvement N=149 | Service gynécologique | 59 | 39,6 |
| | Laboratoire d'anatomie | 90 | 60,4 |

1. Prévalence de la tétracycline chez *Neisseria gonorrhoeae*

Sur 149 isolats analysés par la technique d'électrophorèse, 69 isolats présentent une résistance à la tétracycline avec un pourcentage de 46,3%. La figure 1 présente un exemple des résultats d'amplification de PCR pour la détection de la résistance à la tétracycline pour les échantillons analysés.



Figure1 : Exemple de résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose de 1,5%

MM : Marqueur moléculaire 100 pb.

T+ : Témoin positif.

T- : Témoin négatif.

E1, E6, E9 : Echantillons négatifs

E2, E3, E4, E5, E7 et E8 : Echantillons positifs.

D'autres études antérieures ont montré que la prévalence de TRNG en Chine est de 52,1% effectuées pour un nombre de 1378 isolats (Zheng *et al.* 2015), une prévalence de 50,8% en Pologne (Beata *et al.* 2016) et ceux d'Angleterre avec une prévalence de 43% (Turner, Gough, and Leeming 1999). Une étude réalisée à Tanzanie a révélé un taux de TRNG de 40% (Beattie *et al.* 1999). Par contre, une prévalence très faible de l'ordre de 1 à 2,8% a été détectée en Thaïlande et en Grèce respectivement. Il semble donc que les TRNG soient moins fréquents à Thaïlande et à Grèce qu'au Maroc. (Lawung *et al.* 2012 ; Stathi *et al.* 2006).

Une étude réalisée à Indonésie en 2003 a enregistré une fréquence de TRNG de 61,2%. Les taux de TRNG à Portugal atteignent 77%. Cette différence peut être expliquée par le type de la population étudiée. La population étudiée dans ce présent travail n'est pas à haut risque (PatholBiol 1997).

2. Corrélations entre la résistance de *N. gonorrhoeae* à la tétracycline et les différents variables.

2.1. Corrélation de TRNG et le suivi de grossesse

Dans notre étude, nous avons enregistré que la résistance de *N. gonorrhoeae* à la tétracycline était moins fréquente dans la catégorie des femmes enceintes par rapport à ceux de la catégorie des femmes non enceintes. La résistance à la tétracycline est de 50,8% (62 /69) pour les femmes non enceintes. Les femmes enceintes présentent un pourcentage de 25,9% (7/69) (Figure 2).

Avec une $p=0,019$, le résultat est significative, c'est-à-dire que la résistance à la tétracycline chez *N. gonorrhoeae* est associée au suivi de grossesse.

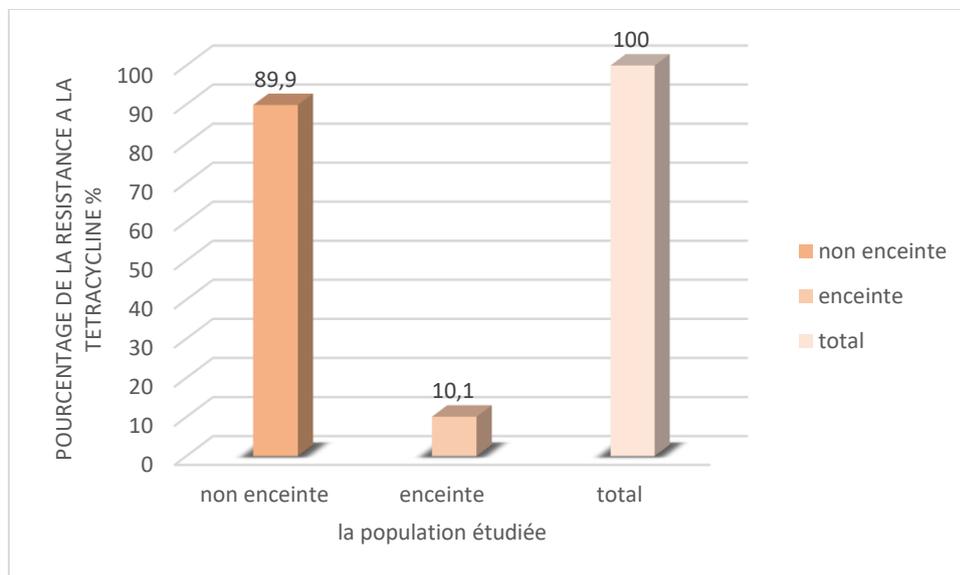


Figure 2: Pourcentage de TRNG en fonction du suivi de grossesse

Cette différence peut être due :

A nombre total d'échantillons inclus dans chaque catégories [femmes non enceintes (N= 37) ; et femmes enceintes (N= 31)]

2.2. Corrélation de TRNG en fonction du groupe d'âge

D'après les résultats obtenus, on remarque que le pourcentage de résistance à tétracycline le plus élevé a été détecté chez les patientes dont leur âge est compris entre 30 et 50 (58%). (Figure3). Nos résultats sont similaires avec des études antérieures menées à Shanghai montrant ainsi que l'âge n'est pas significativement associées à TRNG ($p=0,153$) (Trecker et al. 2014).

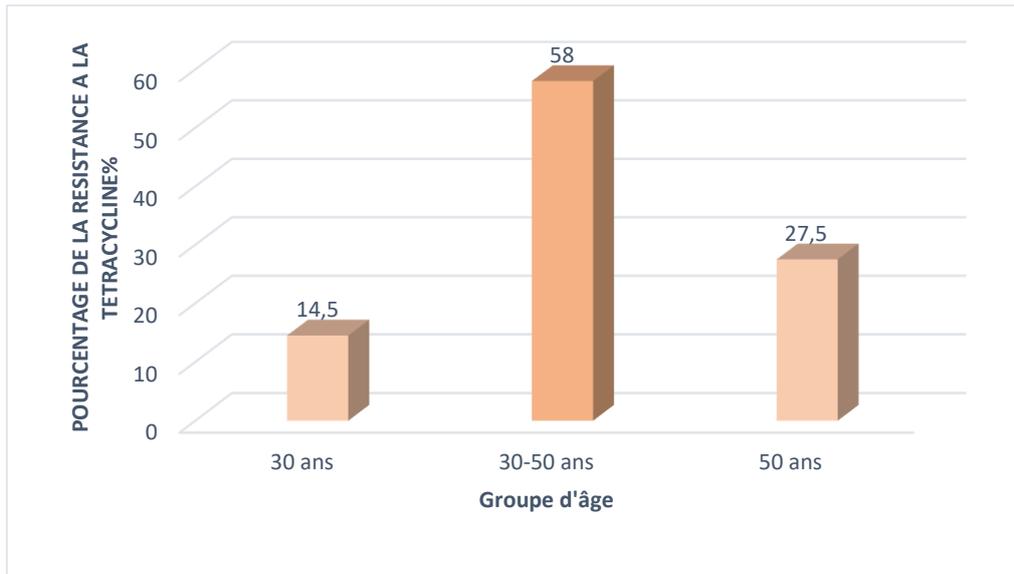


Figure 3 : Pourcentage de TRNG en fonction de groupe d'âge

2.3. Corrélation entre le TRNG et le niveau d'étude

D'après notre étude, on constate que les patientes analphabètes présentent une prédominance importante de TRNG (55,1%) par rapport aux autres niveaux (primaire, secondaire et universitaire) (Figure 4)

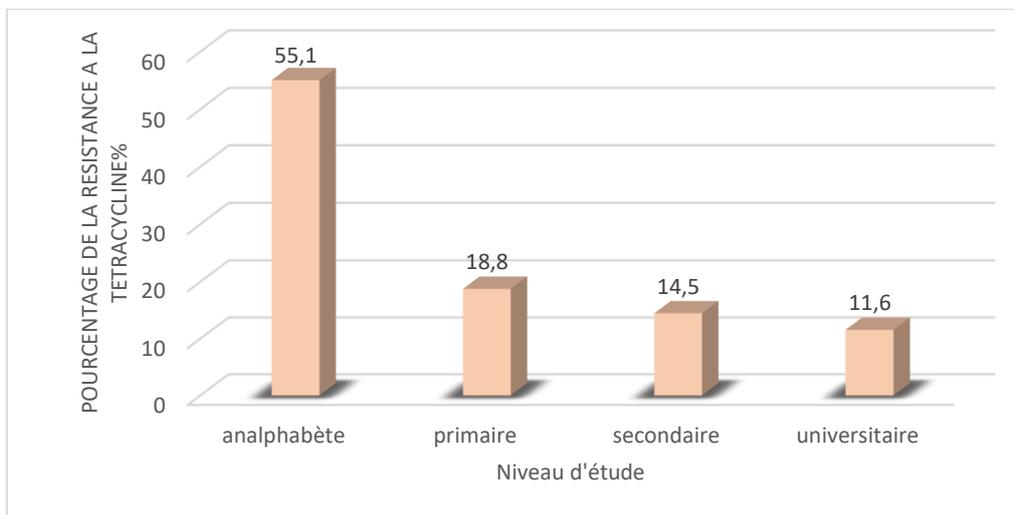


Figure 4 : Pourcentage de TRNG en fonction du niveau d'étude

Nos résultats corroborent avec les mêmes études antérieures menées à Shanghai montrant ainsi le niveau d'étude n'est pas significativement associées à TRNG (Trecker et al. 2014).

Avec une $p=0,134$, le résultat n'est significatif, c'est-à-dire la résistance à la tétracycline chez *N.gonorrhoeae* n'est pas associée au niveau d'étude.

2.4.Corrélation entre le TRNG et le service de prélèvement

Le pourcentage élevé de tétracycline a été détecté chez des patientes du service d'anatomie (69,6%). Le taux est moins important chez les patientes du service gynécologie (Figure 5).

Avec une $p=0,034$, le résultat est significatif, c'est-à-dire la résistance à la tétracycline chez *N.gonorrhoeae* est associée au service du prélèvement.

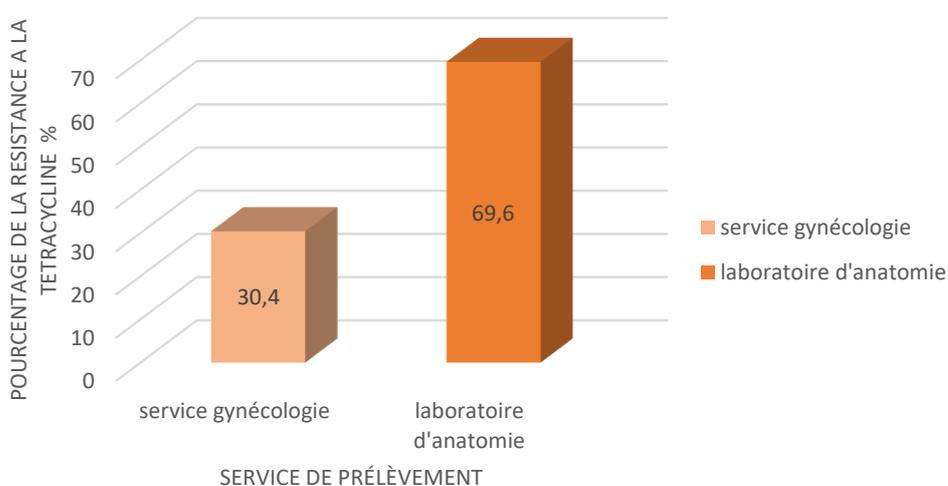


Figure 5 : Pourcentage de TRNG en fonction de service de prélèvement

Les femmes qui consultent le laboratoire d'anatomie montrent une résistance plus importante.

2.5.Corrélation entre le TRNG et le nombre d'enfant

Le pourcentage élevé de la résistance à la tétracycline chez *N.gonorrhoeae* a été détecté chez les patientes ayant un nombre d'enfant inférieur à 3(61,8%).

Nos résultats montrent que la résistance à la tétracycline chez *N.gonorrhoeae* est associée au nombre d'enfant ($p=0,078$).

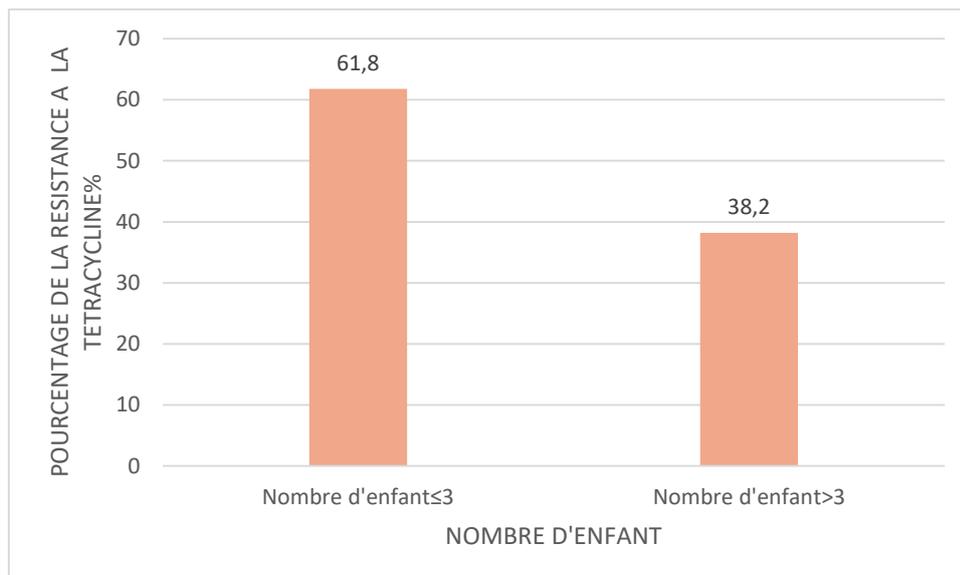


Figure 6 : Pourcentage de TRNG en fonction de nombre d'enfant

Conclusion

Les infections à gonocoques augmentent depuis plusieurs années de façon remarquable, ce qui induit qu'elle devient préoccupante.

Ce rapport établit l'étude de *N.gonorrhoeae* à partir d'un état des lieux des données disponibles concernant ces infections spécifiques, sa prévalence, ces méthodes d'identification, et sa résistance. .

De plus, nous avons utilisé une approche statistique rigoureuse dans notre analyse, ce qui nous a permis de mieux comprendre l'association des variables individuelles à l'infection en présence d'un ensemble de facteurs de risque potentiels.

Cette étude a permis de constater que la résistance chez *N.gonorrhoeae* à la tétracycline est :

- Moins fréquente chez les femmes enceintes (10,1%) que chez les femmes non enceintes (89,9%).
- L'âge n'est pas significativement associé à TRNG ($p=0,153$)
- Les patientes analphabètes présentent une prédominance de TRNG (55,1%) par rapport aux autres niveaux (résultat non significative $p=0,134$).
- Le taux des patientes qui consultent le service de gynécologie est moins fréquent que celui de laboratoire d'anatomie (résultat significatif $p=0,034$).
- Les patientes ayant un nombre d'enfant inférieur à 3 présentent une résistance élevée à la tétracycline (résultat significatif $p=0,078$).

Le défi le plus important aujourd'hui est l'émergence de la gonorrhée multirésistante, qui est actuellement la principale raison de préoccupation du public, ce qui rend le suivi des résistances aux antibiotiques chez *N.gonorrhoeae* une priorité, pour permettre l'adaptation des traitements et la diminution de la diffusion des souches résistantes.

- D. Gilbert et co, « The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2013», 43e édition, 2013B-lactamines, Familles D E S. n.d. “No Title.”
- Beata, Młynarczyk Bonikowska, Marlena Kujawa, Magdalena Malejczyk, Grazyna Młynarczyk, and Sławomir Majewski. 2016. “Plasmid-Mediated Resistance to Tetracyclines among Neisseria Gonorrhoeae Strains Isolated in Poland between 2012 and 2013.” *Postępy Dermatologii i Alergologii* 33 (6): 475–79. <https://doi.org/10.5114/ada.2016.63887>.
- Beattie, T, A Moyes Mphil, C Patrizio, and H Young Dsc Frcpath. 1999. “Subtyping of High-Level Plasmid-Mediated Tetracycline Resistant Neisseria Gonorrhoeae Isolated in Scotland between 1992 and 1998” 1998: 646–51.
- Bennani, Bahia, Sanae Bennis, Chakib Nejjari, L’Houcine Ouafik, Moulay Abdelilah Melhouf, Karima El Rhazi, Kaoutar Znati, Hikmat Chaara, Chahrazed Bouchikhi, and Afaf Amarti Riffi. 2012. “Correlates of HPV: A Cross-Sectional Study in Women with Normal Cytology in North-Central Morocco.” *Journal of Infection in Developing Countries* 6 (7): 543–50.
- Cephalosporin, Third-generation. n.d. “Cefixime.”
- Class, Antibiotic, Macrolide Antimicrobial Spectrum, and Adverse Effects. n.d. “Azithromycin,” 1–3.
- Costa-Lourenço, Ana Paula Ramalho da, Késia Thaís Barros dos Santos, Beatriz Meurer Moreira, Sergio Eduardo Longo Fracalanza, and Raquel Regina Bonelli. 2017. “Antimicrobial Resistance in Neisseria Gonorrhoeae: History, Molecular Mechanisms and Epidemiological Aspects of an Emerging Global Threat.” *Brazilian Journal of Microbiology* 48 (4): 617–28. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.001>.
- Courvalin, Patrice. 2008. “La Résistance Des Bactéries Aux Antibiotiques: Combinaisons de Mécanismes Biochimiques et Génétiques.” *Bulletin de l’Academie Veterinaire de France* 161 (1): 7–12. www.academie-veterinaire-defrance.org.
- “Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines.” n.d.
- Dzidic, Senka, Jagoda Suskovic, and Blaszenka Kos. 2008. “Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects.” *Food Technology and Biotechnology* 46 (1): 11–21.
- Etebu, Ebimieowei, and Ibemologi Arikekpar. 2016. “Antibiotics : Classification and Mechanisms of Action with Emphasis on Molecular Perspectives” 4: 90–101.
- Gianecini, Ricardo, Claudia Oviedo, Cristina Guantay, Laura Piccoli, Graciela Stafforini, and Patricia Galarza. 2015. “Prevalence of BlaTEM-220gene in Penicillinase-Producing Neisseria Gonorrhoeae Strains Carrying Toronto/Rio Plasmid in Argentina, 2002 - 2011.” *BMC Infectious Diseases* 15 (1). BMC Infectious Diseases: 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1294-0>.
- Horn, Nicole Nari, Michael Kresken, Barbara Körber-Irrgang, Stephan Göttig, Cornelia Wichelhaus, Thomas A. Wichelhaus, R. Hörnle, et al. 2014. “Antimicrobial Susceptibility and Molecular Epidemiology of Neisseria Gonorrhoeae in Germany.” *International Journal of Medical Microbiology* 304 (5–6). Elsevier GmbH.: 586–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.04.001>.
- Hsu, Katherine K, and Zoon Wangu. n.d. 126 - *Neisseria Gonorrhoeae. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Fifth Edit. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00126-2>.
- Ieven, M, M Van Looveren, S Sudigdoadi, Y Rosana, W Goossens, C Lammens, A Meheus, and H Goossens. 2003. “Antimicrobial Susceptibilities of Neisseria Gonorrhoeae Strains Isolated in Java, Indonesia.” *Sex Transm Dis* 30 (1): 25–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514438>.
- Jenkins, Claire, R O B J Rentenaar, Luce Landraud, and Sylvain Brisse. 2014. “SECTION 8 Clinical Microbiology: Bacteria 180,” 1565. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285->

- 8.00179-9.
- Johnson, Alan. 2001. "Mechanisms of Antibiotic Resistance Mechanisms of Antibiotic Resistance" 23 (5): 1–24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
 - Lawung, Ratana, Rungrot Cherdtrakulkiat, Angkana Charoenwatanachokchai, and Sunanta Nabu. 2009. "One-Step PCR for the Identifi Cation of Multiple Antimicrobial Resistance in Neisseria Gonorrhoeae." *Journal of Microbiological Methods* 77 (3). Elsevier B.V.: 323–25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.03.009>.
 - Lawung, Ratana, Rungrot Cherdtrakulkiat, Angkana Charoenwatanachokchai, Sunanta Nabu, Somchai Lokpichart, and Virapong Prachayasittikul. 2012. "Antimicrobial Resistance Markers as a Monitoring Index of Gonorrhoea in Thailand." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 59 (2): 157–69. <https://doi.org/10.1556/AMicr.59.2012.2.2>.
 - Lebel, Marc, and D Pharm. n.d. "Evaluations of New Drugs."
 - Marrazzo, Jeanne. 2017. *65 – Management of Gonorrhoea. Infectious Diseases*. Fourth Edi. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00065-4>.
 - Mayor, Mejebit, Michelle Roett, and Kelechi Uduhiri. 2012. "Diagnosis and Management of Gonococcal Infections - American Family Physician." *American Family Physician*. <https://doi.org/d10308> [pii].
 - McSheffrey, Gordon G., and Scott D. Gray-Owen. 2014. *Neisseria Gonorrhoeae. Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Vol. 3. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00082-2>.
 - Ruiz, Joaquim, Anna Ribera, Angels Jurado, Francesc Marco, and Jordi Vila. 2005. "Evidence for a Reserpine-Affected Mechanism of Resistance to Tetracycline in Neisseria Gonorrhoeae." *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 113 (10): 670–74. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_303.x.
 - Stathi, Maria, Alexandros Fliemetakis, Vivi Miriagou, Helen Avgerinou, Kyriakos P. Kyriakis, Antonios N. Maniatis, and Eva Tzelepi. 2006. "Antimicrobial Susceptibility of Neisseria Gonorrhoeae in Greece: Data for the Years 1994-2004." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (4): 775–79. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl040>.
 - Trecker, Molly A., Cheryl Waldner, Ann Jolly, Mingmin Liao, Weiming Gu, and Jo Anne R. Dillon. 2014. "Behavioral and Socioeconomic Risk Factors Associated with Probable Resistance to Ceftriaxone and Resistance to Penicillin and Tetracycline in Neisseria Gonorrhoeae in Shanghai." *PLoS ONE* 9 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089458>.
 - Turner, A., K. R. Gough, and J. P. Leeming. 1999. "Molecular Epidemiology of TetM Genes in Neisseria Gonorrhoeae." *Sexually Transmitted Infections* 75 (1): 60–66. <https://doi.org/10.1136/sti.75.1.60>.
 - Zheng, Heping, Xingzhong Wu, Jinmei Huang, Xiaolin Qin, Yaohua Xue, Weiyang Zeng, Yinyuan Lan, Jiangli Ou, Sanmei Tang, and Mingheng Fang. 2015. "The Prevalence and Epidemiology of Plasmid-Mediated Penicillin and Tetracycline Resistance among Neisseria Gonorrhoeae Isolates in Guangzhou, China, 2002-2012." *BMC Infectious Diseases* 15 (1). BMC Infectious Diseases: 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1148-9>.
 - FerreiraE, LouroD, GomesJP ,CatryMA, Vaz PatoMV. High-level tetracycline resistant Neisseria gonorrhoeae isolated in Portugal. *Pathol Biol* 1997;45:371± 5
 - Site web: "Des Bactéries Résistantes et Leurs Origines." n.d. <http://infectionsnosocomialesstepe.e-monsite.com/pages/des-bacteriesresponsables/des-bacteries-resistantes-et-leurs-origines.html#liy3sj4TKbPliz2Y>

✓ Annexe1: Extraction d'ADN par lyse cellulaire

a) Composition du tampon PBS 10X.

- 2 g KCL.
- 80 g NaCl.
- 11,5 g Na₂HPO₄.
- 2 g KH₂PO₄.
- 1 L d'eau distillée

Le tampon est autoclavé à 120°C pendant 20 min.

b) Composition de la solution de lyse cellulaire par protéinase K

- Tris base (0,06M, Ph9) :12,5µl.
- Protéinase K (20mg/ml) : 2µl.
- Triton X100 (16mg/ml) :3µl.
- Solvant H₂O :187,5µl.

✓ Annexe2 : Purification d'ADN après une lyse cellulaire par la protéinase K

• Préparation de l'acétate de sodium :

- l'acétate de sodium : 246 g.
- l'eau : 1000ml.

La solution est autoclavée à 120°C pendant 20 min.

✓ Annexe3 : Technique d'électrophorèse

a) Composition du tampon TBE 10X.

- acide borique : 55 g
- EDTA : 9,3 g.
- tris base : 108 g.

b) Préparation de TBE

- mélanger les composants dans 1 L d'eau distillée.
- Agitation.
- autoclave.
- la solution finale est 10 X concentrée, à diluer pour obtenir la concentration désirée.

c) Préparation de la solution de charge

- 2,5 mg de Bleu de bromophénol.
- 300 µl de glycérol.
- 700 µl d'eau distillée stérile.