

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Étude comparée du *N. gonorrhoeae* isolé au Cameroun et au Canada

Par
Amélie Ntsama

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

février 1999

Amélie Ntsama, 1999

(c) : droits réservés



W. 4 U58 1999 V.119

W
4
U58
1999
V.119

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

(étude comparée) du V. gonorrhoeae isolés au Canada

Dr.
André Gosselin

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Montrécal, le 15 mai 1999
à l'attention de la bibliothèque de la Faculté de Médecine
Université de Montréal

Dr. Gosselin

Dr. Gosselin

(c) Université de Montréal



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude comparée du *N. gonorrhoeae* isolé au Cameroun et au Canada

Présenté par :

Amélie Ntsama

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari, président-rapporteur

Dr Richard Morisset, directeur de recherche

Dr Madeleine Ravaoarinoro, co-directeur de recherche

Dr Marc Drolet, membre du jury

Sommaire

L'utilisation abusive d'antibiotiques au Cameroun soulève des véritables craintes au sujet des niveaux de sensibilité qui pourraient exister chez des bactéries causant des maladies transmises sexuellement, tel *N. gonorrhoeae*, et d'autres bactéries pathogènes. Notre étude s'est proposée d'analyser les souches de *N. gonorrhoeae*, isolées dans ce pays et de les comparer avec celles du Canada. Dans ces deux cas les mêmes méthodes d'étude ont été utilisées. L'identité des souches a été confirmée par les critères suivantes : la morphologie des souches, le test d'oxydase et les profils d'utilisation des sucres. Leur sensibilité à six agents antimicrobiens a été déterminée. Le test de céphalosporine chromogène a permis de détecter les souches productrices de β -lactamase (nitrocefine). De plus, les plasmides ont été extraits par la méthode de lyse alcaline. Les protéines de la membrane externe ont été analysées sur SDS-PAGE. Toutes les souches étudiées étaient sensibles à la ceftriaxone; la cefixime; la spectinomycine; la ciprofloxacine, à l'exception d'une souche du Cameroun qui a une CMI $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ à la ceftriaxone et à la cefixime. 17/30 (56,7%) des isolats de *N. gonorrhoeae* du Cameroun étaient producteurs de β -lactamase (PPNG) contre 9/50 (18%) de ceux du Canada. Parmi les PPNG du Cameroun 8/17 (50%) d'entre eux étaient résistants à la tétracycline (TRNG). Le pourcentage des isolats résistants à la pénicilline et à la tétracycline du Cameroun et du Canada se chiffre à 56,7% (17/30) et 86,7% (26/30) respectivement, contre 24% (12/50) et 62% (31/50) de celles du Canada. Les souches du Cameroun et du Canada ont été repartis en quatre groupes selon leur sensibilité à la pénicilline et à la tétracycline. L'analyse de leur profil plasmidique montre les bandes à 3,99 Kb; 7,045 Kb; 8,06 Kb et 10,102 Kb. La classification sérologique a montré que le séro groupe WII/III était prédominant chez les souches sensibles et résistantes dans les deux groupes. Cependant, on a observé une expression variable de la protéine II (21,5 kDa), aucune association à la résistance n'a pu être établie.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
DEDICACE	xii
REMERCIEMENTS	xiii
INTRODUCTION	1
1. Généralités.....	3
1.2. Classification du <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5
1.3. Morphologie et structure	7
1.3.1. Morphologie	7
1.3.2. Structure et enveloppe.....	8
1.3.2.1. Membrane cytoplasmique et peptidoglycane.....	9
1.3.3. Structures antigéniques de <i>N.gonorrhoeae</i>	10
1.3.3.1. Pili.....	10
1.3.3.2. Protéine I.....	11
1.3.3.3. Protéine II	14
1.3.3.4. Protéine III.....	15
1.3.3.5. Lipopolyssacharide	16
1.3.3.6. Autres protéines.....	17

1.4. Croissance et métabolisme	18
1.5. Sensibilités aux antibiotiques	19
1.5.1. Pénicilline.....	20
1.5.2. Tétracycline	21
1.5.3. Spectinomycine	22
1.5.4. Ceftriaxone	23
1.5.5. Autres antibiotiques.....	24
1.6 Déterminants et facteurs de résistance aux antibiotiques	26
1.6.1. Plasmide conjugatif	26
1.6.2. Plasmide cryptique	27
1.6.3. Plasmides de résistance à la pénicilline	28
1.6.4. Plasmides de résistance à la tétracycline.....	30
1.6.5. Origine des plasmides de résistance à la pénicilline et à la tétracycline.....	31
1.6.6. Mutations.....	33
1.6.7. Transposons.....	36
1.7. Échange génétique	37
1.7.1. Transformation.....	37
1.7.2. Conjugaison	38
1.8 Manifestations cliniques de l'infection gonococcique	39
1.8.1. Infection gonococcique	39
1.8.2. Infection non compliquée	40
1.8.3. Maladie inflammatoire pelvienne.....	42
1.8.4. Infection gonococcique disséminée.....	43

1.9. Diagnostic de laboratoire	45
1.10. Traitement	46
1.11. Épidémiologie	47
2. Matériels et Méthodes	51
2.1. Matériels	51
2.1.1 Souches bactériennes	51
2.1.2. Antibiotiques et produits chimiques	53
2.1.3. Milieux de culture	55
2.1.4. Appareils utilisés	55
2.2. Méthodes	56
2.2.1. Caractérisation des souches	56
2.2.1.1. Identification des souches	56
2.2.1.2. Détection des β -lactamases	57
2.2.1.3. Serotypage	58
2.2.1.4. Test de sensibilité aux antibiotiques	58
2.2.1.5. Extraction des plasmides	60
2.2.1.5.1. Électrophorèse des plasmides	61
2.2.1.5.2. Estimation du poids moléculaire	61
2.2.1.6. Profils électrophorétiques des protéines par SDS-PAG	62
2.2.1.6.1. Croissance bactérienne et préparation à l'extraction de la membrane externe	62
2.2.1.6.2. Extraction de la membrane externe	63
2.2.1.6.3. Isolation des protéines de la membrane externe	63

2.2.1.6.4. Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide	64
2.2.1.6.5. Coloration des gels	65
2.2.1.6.6. Détermination des poids moléculaires.....	65
3. Résultats	66
3.1 β -lactamase.....	66
3.2. serotypage	66
3.3. Sensibilité aux agents antimicrobiens	66
3.4. Profils plasmidiques	71
3.5. Profils électrophorétiques de protéines de la membrane externe.....	72
4. Discussion	79
5. Conclusion	94
6. Références	96

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
CDC :	Center for Disease Control
D.O :	Densité optique
EDTA :	Acide tétra-acétique d'éthylènediamine
kDa :	Kilodalton
MDa	Megadalton
NCCLS :	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCP :	Protéine cible de la pénicilline
PI :	Protéine I
PIA :	Protéine I de type A
PIB :	Protéine I de type B
PII :	Protéine II
PII :	Protéine III
PPNG :	Productrice de Pénicillinase de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
SDS-PAGE :	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
TEMED :	Tétraméthyl éthylène diamine
TRNG :	Tétracycline résistante de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
V :	Volt

min : minute
ml : millilitre
 μg : microgramme

Liste des tableaux

Tableau 1 : Provenance des souches étudiées.

Tableau 2 : CMI de six antimicrobiens et incidence de résistance de *N.gonorrhoeae* isolés au Cameroun.

Tableau 3 : CMI de six antimicrobiens et incidence de résistance de *N.gonorrhoeae* isolés au Canada.

Liste des figures

Figure 1 : Profils électrophorétiques sur gel d'agarose à 0,8% des plasmides des 12 souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Cameroun.

Figure 2 : Profils électrophorétiques sur gel d'agarose à 0,8% des plasmides des souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada.

Figure 3 : Profils électrophorétiques des protéines de la membrane externe sur gel de polyacrylamide-SDS à 12,5% des souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Cameroun.

Figure 4 : Profils électrophorétiques des protéines de la membrane externe sur gel de polyacrylamide –SDS à 12,5% des souches de *N.gonorrhoeae* isolées au Canada.

Figure 5: Profils électrophorétiques sur gel d'agarose à 0,8% des plasmides des souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada et au Cameroun

Figure 6: Profils électrophorétiques sur gel d'agarose à 0,9% des plasmides des souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada et au Cameroun

Dedicace

Ce mémoire est dédié à Dieu et à mon époux Hugues Ngaleu qui ont su me soutenir et me supporter tout le long de l'élaboration de ce travail.

Remerciements

Je voudrais témoigner ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le docteur Richard Morisset, et à mon codirecteur, le docteur Madeleine Ravaoarino pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Un merci particulier au docteur Madeleine Ravaoarino : votre disponibilité, vos conseils et vos encouragements ont été très profitables. Merci.

J'aimerais remercier l'ensemble de mes collègues de travail qui ont contribué à rendre mon séjour des plus agréables et particulièrement Sangaré Lassana pour ses conseils techniques et Annie Chamberland. Sylvie Legault la secrétaire du laboratoire de microbiologie de l'hôtel-Dieu de Montréal pour son accueil et sa gentillesse.

Un merci tout spécial à mes parents, particulièrement à ma mère Madame Bounoung Gertrude et ses frères et soeurs, et à mes amis : Dr Franklin J. Eyelom et particulièrement à Edoa Virginie pour leur prière, leur patience et leurs encouragements.

Un merci chaleureux à mon époux Hugues Ngaleu, pour sa compréhension, son support moral, ses encouragements et pour son soutien financier, sans oublier tous les frères de la maisonnée.

Introduction

La versatilité du *Neisseria gonorrhoeae* et sa capacité de s'adapter au changement du microenvironnement ont été remarquées dès après l'introduction des agents thérapeutiques. C'est sans doute les raisons qui ont incité les scientifiques à étudier les mécanismes par lesquels le gonocoque arrive à s'adapter aux changements. Malgré la connaissance de certains de ces mécanismes qui sont dûs soit à des mutations chromosomiques, soit à l'acquisition des plasmides R, la croissance de la résistance demeure. L'évolution de celle-ci est due aux interactions entre les facteurs génétiques et l'effet sélectif environnemental. Les rapports sur l'incidence de la résistance de *N. gonorrhoeae* à la pénicilline et à la tétracycline incitent l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à réviser la première ligne de thérapie pour la gonococcie non compliquée. Cependant, ces médicaments s'avèrent très onéreux ou parfois non disponibles dans les pays en voie de développement. Dans ces pays, cette résistance peut être aussi élevée que 80%. Par ailleurs on observe une décroissance de la sensibilité aux nouveaux agents antimicrobiens (ciprofloxacine et ofloxacine). Le tourisme et l'immigration favorisent la dissémination des souches résistantes à travers le monde. Ceci suscite l'inquiétude des professionnels de la santé. Les infections à gonocoques demeurent de ce fait un problème de santé publique.

L'utilisation massive des antibiotiques pour le traitement des infections à gonocoques et d'autres microorganismes associés aux maladies transmises sexuellement sont la cause de la résistance aux agents antimicrobiens.

L'automédication, l'utilisation abusive des agents antimicrobiens dans le traitement curatif et la prophylaxie des infections, et l'absence d'un programme de surveillance de la résistance aux antibiotiques les plus couramment utilisés sont les conditions prévalentes au Cameroun. Cette situation va favoriser le développement de la résistance bactérienne. Tous ces faits cités plus haut motivent cette étude.

Nous nous proposons de caractériser 80 souches cliniques de *N. gonorrhoeae* dont 30 souches ont été isolées au Cameroun et 50 souches au Canada, afin de savoir si celles-ci ont une incidence significative sur leur résistance vis-à-vis de certains antibiotiques par :

- 1- la détection de pénicillinase,
- 2- la détermination de leur sensibilité à six agents antimicrobiens,
- 3- la détermination de leurs sérotypes, afin de mettre en évidence leurs liens avec la résistance,
- 4- l'identification des mécanismes de résistance présents chez ces souches de *N. gonorrhoeae*, en analysant les profils des protéines de la membrane de la membrane externe (OMP), et des plasmides.

1. Généralités

N. gonorrhoeae fait partie des cocci à gram négatif. C'est un agent infectieux qui fut décrit par Albert Neisser en 1879. Le groupe *Neisseria* comprend également le pathogène *Neisseria meningitidis*, ainsi que les germes saprophytes de la bouche et de la gorge. L'être humain est son seul hôte. Il se transmet surtout par contact sexuel chez les adultes avec un partenaire infecté, symptomatique ou non. La transmission non sexuelle est rare (Gilbaugh, 1979) et ceci s'explique par la fragilité du gonocoque à vivre à l'extérieur de l'organisme, cependant le risque de contamination existe. Le gonocoque produit une inflammation aiguë de l'épithélium colonnaire urogénital. Chez l'homme, il se manifeste dans 90% de cas, par une urétrite purulente aiguë, qui peut se compliquer en une prostatite, des abcès péri-urétraux et une épididymite. Chez la femme l'infection se localise au niveau de l'endocol, des glandes de Skène, des glandes de Bartholin, des glandes para-urétrales et des trompes de Fallope. Mais dans 50 à 75% de cas, elle reste asymptomatique.

L'ophtalmie purulente du nouveau-né acquise lors de l'accouchement, reste le cas de contamination non-vénérienne, par contact avec les sécrétions vaginales infectées de la mère. L'infection génitale ascendante non traitée chez la femme amène des complications se traduisant par des pelvipéritonites. Elle demeure l'une des causes les plus communes d'infertilité et de grossesses ectopiques (Sweet, 1987). La gonococcémie et la ténosynovite sont aussi des conséquences importantes de cette maladie.

Les patients porteurs asymptomatiques risquent de développer une infection disséminée ou pelvienne. On observe fréquemment une infection concomitante à *Chlamydia* dont 20 à 30% des hommes et 30 à 50% des femmes se présentent avec une gonorrhée associée à une infection à *Chlamydia* (Ronald et Peeling, 1993). *N. gonorrhoeae* est un diplocoque à gram négatif, non sporulé morphologiquement similaire à *N. méningitidis*. Il est aérobie, produit de la catalase, et du cytochrome. Il se différencie d'autres espèces de *Neisseria* par son utilisation exclusive du glucose.

La biologie complexe de la bactérie résulte principalement en une grande capacité de variation des structures de surface, en un pouvoir d'induire la production d'anticorps qui peuvent nuire à l'action bactéricide du sérum, et en la capacité de produire des enzymes qui favorisent, entre autres, l'augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens. Par ailleurs, la libération des mœurs et un manque d'éducation sexuelle favorisent la propagation de la maladie au sein des populations. Très peu de pays possèdent un système de surveillance permettant d'avoir une véritable estimation de la prévalence du gonocoque. Au cours de ces dernières années, le nombre de gonorrhée est en diminution dans les pays industrialisés (Anonyme, 1991; Danielson, 1990). Dans les pays en voie de développement, il y a plutôt une haute prévalence et une incidence élevée de la gonorrhée ainsi que d'autres maladies sexuellement transmises (Piot et Tezzo, 1990). Le contrôle et la prévention de cette maladie vont donc dépendre de l'éducation communautaire et individuelle, du diagnostic et du traitement des infections.

1.2. Classification du *Neisseria gonorrhoeae*

Pour les raisons épidémiologiques les souches de *N. gonorrhoeae* sont le plus souvent classées selon la composition de la membrane externe en protéines (séro groupe), les caractéristiques physiologiques (auxotype), le contenu plasmidique, et la capacité d'agglutination avec différentes lectines.

Les sérogroupes de *N. gonorrhoeae* sont identifiés, soit par le test d'immunofluorescence, soit par des techniques de co-agglutination. Cette technique est basée sur l'aptitude de la protéine A de *Staphylococcus aureus* à se lier à la fraction Fc des immunoglobulines G (IgG). Les anticorps monoclonaux dirigés contre les différentes protéines de la membrane externe du gonocoque vont se lier à la protéine A du staphylocoque par la fraction Fc du complément. Les gonocoques se fixent spécifiquement à la fraction Fab et forment un réseau d'agglutination visible. Cette technique est disponible en trousse commerciale, et reste la plus utilisée parce qu'elle est simple, très spécifique, reproductible et rapide.

Les plasmides ne sont pas une caractéristique stable chez le gonocoque. Leur capacité discriminatoire est faible, et s'avère limitante pour utilisation comme seul outil épidémiologique. Par conséquent, les plasmides sont étudiés en relation avec d'autres paramètres. Certains profils caractéristiques sont utilisés pour la classification des souches. Ceux-ci sont liés à l'aire géographique: par exemple le plasmide de 3,2 MDa permet d'identifier les souches africaines et celui de 4,5 MDa les souches asiatiques.

Des études ont montré que les souches cliniques de *N. gonorrhoeae* présentant une diminution de la sensibilité à la pénicilline et à plusieurs autres antibiotiques sont généralement du sérogroupe WII/WIII ou PIB (Bygdeman, 1981; Rice et coll., 1986; Palomares et coll., 1990; Ison et coll., 1990, Ison et Easmon, 1991; Knapp et coll., 1987). Bygdeman et coll., (1982) ont démontré l'introduction de la résistance chez les souches WI ou PIA sensibles, par transformation avec des souches multirésistantes de sérogroupe WII/WIII (PIB) dans 100% des essais. Ces résultats montrent qu'il existe une possibilité de transformation simultanée de deux gènes, l'un coderait pour la résistance et l'autre pour une protéine de la membrane externe.

Par opposition à ces rapports, Tzanakaki et coll., (1989) ont trouvé des différences au niveau des sérogroupe et de la sensibilité aux antibiotiques. Ceci démontre la grande diversité des phénotypes existant chez le gonocoque. On associe les sérogroupe du gonocoque à un certain type d'infection. En effet, le gonocoque isolé des patients ayant une infection disséminée ou asymptomatique est généralement du sérogroupe WI (Knapp et Holmes, 1975; Ison et coll., 1987; Woodford et coll., 1989). Ces souches sont reconnues comme étant très résistantes à l'action bactéricide du sérum humain. Par contre, les souches ayant le sérogroupe WII/WIII sont le plus souvent isolées de patients présentant des infections cliniques localisées. Fréquemment, ces souches sont isolées du rectum chez des homosexuels mâles (Bygdeman, 1981; Reid et Young, 1984).

1.3. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE

1.3.1. Morphologie

On observe chez le *N. gonorrhoeae* une grande variation au niveau de l'aspect des colonies (Gotschlich, 1980; Morello et coll., 1976; Morse, 1979) après croissance sur des milieux de culture solide. L'étude de ce phénomène a permis d'obtenir plusieurs renseignements précieux au sujet de la composition de la surface de cette bactérie (dimension, bordure, couleur et opacité), ainsi que sur différentes propriétés biologiques. Swanson., (1978, 1979, 1980) et Heckels et coll., (1981) ont attribué les variations d'apparence des colonies à la présence de deux groupes de molécules à la surface bactérienne (les pili, ou les protéines de surface PII). Il est possible de relier certains aspects de la pathogénicité du gonocoque (adhérence, sensibilité aux sérums humains, le pouvoir d'invasion) à l'apparence des colonies (James et coll., 1978). Selon la classification de Kellogg et coll., (1963) il existe quatre types distincts de colonies (T1 à T4). Les types 1 et 2 sont des colonies de petit diamètre (0.5 mm), de couleur foncée, convexes, composées de cellules piliées et sont considérés comme virulents. Les types 3 et 4 sont des colonies d'un diamètre plus grand (1 mm), de couleur pâle, peu élevées, composées de cellules non piliées et, sont moins virulents.

Odugbemi et coll., (1978); Salit et coll., (1982); Gonzales et coll., (1984) ont observé qu'une faible concentration de fer, la présence d'antibiotiques, d'uracile, de pyruvate ou d'hormones sexuelles dans le milieu de culture peut faire varier l'aspect des

colonies. En outre des colonies exprimant le phénotype transparent peuvent posséder, à la surface de leurs cellules, des PII ne contribuant pas à l'opacité des colonies.

1.3.2. Structure et enveloppe

La structure de base de la membrane de *N. gonorrhoeae* est semblable à celle des autres bactéries à gram négatif. Elle possède une enveloppe composée de trois différentes couches: une membrane externe, une couche médiane de peptidoglycane, et une membrane interne. La membrane externe est constituée des phospholipides, des lipooligosaccharides, des pili ainsi qu'une variété des protéines.

Chez les bactéries à gram négatif, c'est au niveau de la membrane externe et interne que se produisent les modifications liées à la résistance de type chromosomique aux agents antimicrobiens. Les porines sont des protéines qui permettent la diffusion passive de molécules hydrophiles comme certains antibiotiques. Les mutations chez les gonocoques peuvent réduire la perméabilité de cette membrane à divers antibiotiques et aussi à certains colorants et détergents. Ces mutations qui affectent la perméabilité de la membrane externe peuvent s'exprimer seules ou de façon additive (Dougherty, 1986; Guymon et coll., 1978; Faruki et Sparling, 1986). Selon le cas, il peut se produire une réduction ou une perte totale de la sensibilité à plusieurs antibiotiques.

Dougherty et coll., (1981) et Barbour (1981) ont établi l'importance des altérations chez des souches isogéniques, ce qui suggère que les protéines cibles de la

penicilline (PCP) puissent être altérées par des mutations chromosomiques. Chez *N. gonorrhoeae*, cette résistance est associée à une réduction de la PCP2. Dans certains cas la PCP1 peut être altérée à un degré moindre (Barbour 1981; Dougherty et coll., 1985). Chez les souches résistantes où la PCP2 est absente, la PCP1 joue le rôle physiologique de la PCP2 (Dougherty et coll., 1981).

1.3.2.1. Membrane cytoplasmique et peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère d'acides aminés et de sucres formant une couche mince entre la membrane externe et la membrane interne. Il est synthétisé à partir des protéines spécifiques situées dans la membrane interne de *N. gonorrhoeae*. Il sert à maintenir la rigidité de la structure bactérienne.

Chez le gonocoque la synthèse du peptidoglycane se fait en plusieurs étapes; les protéines cibles de la pénicilline (PCPs) sont responsables des deux dernières étapes (transglycosylation et transpeptidation). Ces protéines ont un poids moléculaire élevé et une capacité à se lier de façon covalente avec la pénicilline et à d'autres antibiotiques de type β -lactamine. L'absence de ces protéines ou la diminution de leur affinité avec ces antibiotiques conduit à une résistance de la bactérie à ces antimicrobiens. Trois PCPs (1, 2, et 3), de poids moléculaires respectifs de 87, 59 et 44 kDa, ont été identifiées chez *N. gonorrhoeae* (Barbour, 1981). La fonction de la PCP 1 réside dans la transpeptidation au cours de la synthèse du peptidoglycane. Celle de la PCP 2 se situe au niveau de l'o-acétylation (Dougherty, 1985). Quant à la PCP 3, son rôle demeure encore inconnu.

1.3.3. Structures antigéniques de *N. gonorrhoeae*

La plupart des événements conduisant à une infection, incluant l'attachement et l'internalisation, sont certainement véhiculés par les structures de surface du gonocoque. Avec l'émergence de la résistance aux antibiotiques, la recherche se base à l'heure actuelle sur l'identification de ces composantes. Une fois que ces protéines ont été identifiées, il reste à trouver leur rôle dans la pathogénicité. Ces composantes se présentent en trois grands groupes dans le gonocoque: les pili, les lipopolysaccharides, et certaines protéines de la membrane externe.

1.3.3.1. Pili

Plusieurs bactéries à gram négatif possèdent des annexes cylindriques flexibles. Celles-ci sont amarrées dans la cellule et s'étendent dans certains micromètres à travers elle. Les pili sont des extensions protéiques qui proviennent du cytoplasme et traversent la membrane externe. Ils sont composés de plusieurs sous-unités répétitives identiques d'une protéine appelée piline. Son poids moléculaire est environ 19 kDa (Buchanan et coll, 1978).

Les pili du gonocoque ont été le premier antigène associé à la virulence. Le passage continu du gonocoque sur un milieu solide entraîne des changements morphologiques des colonies. Ces changements marquent la différence dans la virulence de la bactérie.

Des études sur les effets des pili pendant l'infection démontrent qu'ils jouent un rôle important dans l'adhésion des bactéries aux cellules des mammifères pendant l'infection. Ils sont donc responsables de l'attachement à la surface des cellules épithéliales et sont liés à l'état de compétence par transformation. Le poids moléculaire des sous-unités des pili du gonocoque est très variable, tant au sein de la même souche qu'entre autres. Lambden et coll., (1981) ont démontré qu'une souche de gonocoque P9 possède de pili avec des poids moléculaires variant de 18,5 à 20 kDa. Chez le gonocoque l'autolyse débute promptement. Un pool d'ADN du gonocoque exogène est disponible dans les cellules compétentes, et peut être utilisé dans les effets de conversion de gènes pour altérer le prototype des pili. L'ADN saisit les mutants déficients et les cellules normales traitées avec la DNase.

En conclusion la présence de pili à la surface des gonocoques favorise l'adhérence aux cellules épithéliales des muqueuses. Cet avantage qu'ont les pili peut disparaître lors des repiquages successifs *in vitro* (Lambden et coll., (1982); Swanson (1978)). Ceci indique qu'une pression sélective favorisant la présence de pili est exercée par l'hôte. La grande variabilité des sous-unités de piline confère un avantage aux gonocoques. Ils peuvent ainsi résister aux défenses immunitaires de l'hôte (Swanson et Barrera, 1983 ; Cannon et coll., 1984).

3.3.2. PROTÉINE I

Cette protéine est souvent appelée la protéine majeure de la membrane externe (MOMP: major outer membrane protein). La protéine I (PI) constitue plus de 60% des

protéines totales. Au sein d'une souche de *N. gonorrhoeae* la PI est constante. Cependant il existe des variations entre les souches. Ces variations sont observées dans les différents poids moléculaires entre 32-38 KDa (Johnston et coll., 1976 ; Lambden et coll., 1979 ; Swanson, 1977).

La PI existe sous deux formes liées par leur structure, PIA et PIB. La forme PIA tend à être relativement plus petite avec des poids moléculaires variants entre 32-36 kDa, tandis que celle de la PIB a des poids moléculaires variants entre 36-38 kDa.

La classification sérologique du gonocoque est basée sur cette protéine à cause de son expression relativement stable. Wang et coll., (1977) ont distingué trois groupes sérologiques (A, B, et C) au sein de l'espèce *N. gonorrhoeae* en utilisant un test immunofluorescent. Cette méthode a été remplacée par un test de coagglutination qui divisait le gonocoque en trois groupes sérologiques distincts, WI, WII et WIII (Sandström et Danielson, 1980). Puis cette méthode a été alors améliorée par le développement d'un test d'ELISA avec PI partiellement purifiée. Celui-ci divise le séro groupe WI en sérotypes 1, 2 et 3 ; le séro groupe WII en sérotypes de 4,5,6,7 et 8; et WIII en sérotype 9. Des études subséquentes ont permis l'identification de deux expressions différentes de cette protéine, protéine IA (PIA) et protéine IB (PIB). Deux séparations dimensionnelles d'aperçus triptyques ont montré que les protéines WII et WIII ont toute la protéine PIB, tandis que le groupe WI a la protéine PIA.

Toutes ces méthodes de classification utilisaient des anticorps polyclonaux. Tam et coll., (1982) ont développé une méthode utilisant six anticorps monoclonaux spécifiques de la PIA et six autres de la PIB. Les souches ont été caractérisées sérologiquement par leur test de réactivité avec ces anticorps monoclonaux, et chaque test réactif était appelé sérovar. Cette méthode a permis d'identifier 18 sérovars PIA et 28 sérovars PIB (Knapp et coll, 1984). Ces anticorps sont utilisés pour les études épidémiologiques.

Les souches porteuses de PIA ont été associées à la résistance. La PI se présente sous forme de trimère. Ces trimères peuvent s'associer à une molécule de la PIII et le lipopolysaccharide, formant ainsi des structures complexes de la membrane externe. La structure trimérique agit comme une porine, contribuant au passage sélectif des molécules hydrophiliques à travers la membrane externe (Blake et coll., 1983).

Au départ la génétique de la membrane externe du gonocoque a été très peu comprise. Cannon et coll., (1980) lors des études de transformation génétique, ont observé que lorsque le gène *nmp-1* (new membrane protein), était transféré la souche réceptrice exprimait une nouvelle PI de poids moléculaire plus élevé. Ce poids était semblable à celui de la souche donatrice. Ils ont aussi noté, qu'il y avait transfert simultané du marqueur génétique *penB2* (ce dernier étant proche du gène *nmp-1*, mais distinct sur la carte génétique du gonocoque), ce qui entraîne une augmentation de la résistance non spécifique à plusieurs colorants et antibiotiques.

1.3.3.3. Protéine II (PII)

La protéine II est une protéine monomérique impliquée dans l'adhésion du gonocoque aux cellules épithéliales et aux neutrophiles. Son poids moléculaire varie de 20 à 30 kDa selon le mode d'extraction ou la température. La solubilisation de cette protéine à 37°C donne des poids moléculaires plus faibles que lorsqu'elle est solubilisée à haute température (Blake, 1985). Par ailleurs ce poids moléculaire n'est pas modifié en présence des agents réducteurs (Heckels, 1977; 1981). Le poids moléculaire apparent et l'antigénicité des PII synthétisées par divers variants d'une même souche sont très variables (Lambden et coll., 1979 Swanson, 1977). Elle a des similarités fonctionnelles avec les pili, et est liée à l'apparence des colonies. Les colonies qui la possèdent sont opaques (PII⁺) et celles qui sont dépourvues sont transparentes (PII⁻). Cependant, il y a des PII qui ne contribuent pas à l'opacité des colonies. En effet, à l'aide de marqueur à l'iode radioactif, on a observé la présence de PII à la surface des cellules formant des colonies de phénotype transparent (Swanson., 1982). A la différence de la PI, la PII se présente en quantité variable. Elle est caractérisée par un profil antigénique d'évolution variable et rapide. Son expression varie durant l'infection selon la localisation anatomique de l'infection. Parfois, les souches isolées du pharynx, du rectum et du col utérin d'un même patient sont différentes. Cette différence s'observe parmi les souches isolées du col utérin pendant les menstruations probablement à cause des modifications dans les protéases, le pH, les hormones ou d'autres facteurs (James et Swanson, 1978). Les souches des sites normalement stériles comme les trompes de Fallope, le sang et le liquide

synovial présentent des colonies transparentes. Par contre, les bactéries isolées des muqueuses ont une apparence opaque (Swanson, 1982; Draper et coll., 1980).

En 1982 Swanson a démontré qu'une souche de gonocoque peut synthétiser jusqu'à 6 PII différentes. Mais, on ne peut observer qu'une ou deux à la surface des cellules d'un variant particulier. Selon Diaz et Heckels (1982), il est probable que les populations de *N. gonorrhoeae* changent continuellement leur composition en PII devenant ainsi des cibles antigéniques difficiles à suivre pour le système immunologique. Récemment Swanson et Barrera (1983) ont montré que les PII partagent un épitope commun peu accessible pour les anticorps. Chaque PII porte un antigène qui lui est propre.

1.3.3.4. Protéine III (PIII)

Elle a été décrite pour la première fois par McDade et Jonhson (1980), cette protéine est similaire chez toutes les souches de gonocoques (Blake et coll., 1981). Elle se présente sous forme de monomère. Selon Swanson et coll., (1982) la PIII est un antigène de surface commun à plusieurs souches. Il est très difficile de l'obtenir à l'état pur car elle est fortement liée à la PI. Cependant on peut l'obtenir sous la forme d'hétéropolymère, ce qui favoriserait les réactions croisées lors du sérotypage (Judd, 1982 b, McDade et Johnson 1980, Newhall et coll., 1980). Cependant, il est possible de les séparer avec des traitements à des pH plus élevés que ceux utilisés pour la purification de PI et PII. Contrairement à la PI, la PIII est résistante à l'action d'enzymes

protéolytiques (Blake et coll., 1981). Son poids moléculaire varie entre 30 et 31 kDa. En présence des agents réducteurs le poids moléculaire de la PIII est de 31 kDa et est de 30 kDa en absence de tel réactif (Blake et coll., 1985). La fonction de la PIII n'est pas complètement élucidée. Il semble qu'elle joue un rôle important dans la pathogénie. Elle empêche la liaison des anticorps à la bactérie, diminuant ainsi l'action bactéricide du sérum (Wetzler et coll., 1989) et facilitant la dissémination du microorganisme (Joiner et coll., 1985; Rice et coll., 1986). Virji et Heckels, (1989) ont découvert un épitope sur un anticorps monoclonal auquel on attribue cet effet de blocage.

1.3.3.5. Lipopolysaccharide (LPS)

Un lipopolysaccharide complet ou de type "S", est en partie composé d'un polysaccharide antigénique "O" de poids moléculaire élevé. Ce polysaccharide spécifique à l'espèce bactérienne, est lié à un "core" généralement composé de monosaccharide ainsi que de l'acide 2-céto-3-déoxy-octonique (KDO). Le "core" quant à lui est lié, via un des résidus KDO, au lipide A, principale structure responsable de la toxicité du LPS (Stephens et coll., 1982). Le LPS possède une région hydrophile polaire, le polysaccharide "core", et une région hydrophobe, le lipide A. On trouve également un LPS de type "R" où le "core" est lié seulement au lipide. Les LPS comme beaucoup d'autres antigènes du gonocoque, sont hautement variables (Griffiss et coll., 1989). Sur SDS-PAGE les LPS du gonocoque apparaissent entre 3,2 et 7,1 kDa, comme ceux des mutants d'autres bactéries à gram négatif telles que : *E. coli*, *Salmonella thyphimurium* (Schneider et coll., 1984). Ces mutants ne produisent pas d'antigène "O" qui fut trouvé

absent des LPS du gonocoque (Stead et coll., 1975). La structure chimique et physique générale de LPS du gonocoque a été élucidée et ressemble étroitement aux glycosphingolipides humains plutôt qu'aux LPS des bactéries entériques (Griffiss et coll., 1988). Le lipide A est essentiellement conservé, mais il est substitué à des quantités variables d'acides gras ^{14}C , qui sont des variables hydrociliés. La variation du poids moléculaire de ces antigènes dépend de la portion polysaccharidique de la molécule. Cet antigène est la cible des anticorps bactéricides dans le sérum humain normal. Il a été montré que sur une infection, cet antigène stimule la réponse immunitaire (Apicella et coll., 1986). Par conséquent ces propriétés endotoxiques sont responsables du dommage tissulaire survenant lors d'une infection naturelle. On ne connaît pas encore l'importance exacte du LPS en tant que déterminant de la pathogénicité chez *N. gonorrhoeae*, mais la composition du LPS semble déterminée ou influencée certaines propriétés phénotypiques de la cellule (Guymon et coll., 1982).

1.3.3.6. Autres protéines

Plusieurs autres protéines de la membrane externe du gonocoque ont été également caractérisées. On retrouve l'antigène H8 de poids moléculaire apparent de 30 kDa (solubilisé à 100°C), alors que cette molécule n'est pas présente à la surface des autres espèces de *Neisseria* (Cannon et coll., 1984). Newhall et coll. (1980) ont décrit un complexe protéique à poids moléculaire élevé, qu'ils ont désigné "OPM-MC", et celui-ci est retrouvé chez tous les gonocoques. D'autres chercheurs ont observé que lorsque la croissance du gonocoque se fait dans un milieu riche en fer, il y a apparition de protéines

de 100, 70, et 30 kDa à la surface de la membrane externe. Ces protéines sont responsables de l'incorporation du fer dans la cellule (Cannon et coll., 1984). Et elles sont probablement des composantes d'un système riche en fer et ont une affinité hautement similaire à d'autres pathogènes à gram négatif (Neilands 1982).

La protéase IgA est produite à la fois par *N. gonorrhoeae* et *N. méningitidis*. Elle pourrait être un facteur de virulence, mais sa fonction n'a pas encore été clairement définie (Plaut et coll., 1975). Le dernier groupe de protéines de surface reconnues comprend les complexes macromoléculaires d'OMP de poids moléculaires très élevés (Newhall et coll, 1980, Hansen et Wilde, 1984) qui sont présents chez toutes les souches de gonocoques et toutes les souches antigéniquement reliées.

1.4. Croissance et métabolisme

N. gonorrhoeae est un microorganisme difficile à cultiver à cause des acides gras toxiques et des traces de métaux contenus dans la peptone et l'agar (Gotschich, 1980), qui entrent dans la fabrication des milieux de culture. Les gonocoques sont des microorganismes à gram négatif atypiques en ce qui concerne sa sensibilité aux acides gras à longue chaîne. La membrane externe de sa paroi cellulaire est très perméable aux acides gras. La composition du milieu de culture détermine le temps de génération (une cinquantaine de minutes dans un milieu très complexe), le métabolisme et la composition du gonocoque (Morse, 1979).

Le gonocoque requiert le fer libre pour sa croissance (Morse, 1979). Celle-ci est optimale à une température se situant entre 35 et 37°C, à pH de 7,2 et est stimulée par la présence de 5 à 10% de CO₂. L'humidité est également très importante (Morello et coll., 1980; Todd et coll., 1984). Le gonocoque n'utilise efficacement que le glucose, l'acide pyruvique et l'acide lactique comme source d'énergie (Morse, 1979; Morse et coll., 1980). On retrouve chez le gonocoque les enzymes des principales voies d'utilisation du glucose (Enter-Doudoroff, Embden-Meyerhof, et la voie des pentoses), mais la voie d'Enter-Doudoroff serait la plus utilisée (Morse, 1979). Ces bactéries sont des microorganismes fastidieux qui ont des besoins complexes pour leur croissance. Les *Neisseriaceae* sont facilement différenciables par leur capacité à fermenter certains hydrates de carbone. Chez le gonocoque, les carbohydrates utilisés comme source de carbone sont le glucose, le lactate ou le pyruvate (Catlin, 1973). Cette caractérisation permet de différencier le *N. gonorrhoeae* des autres espèces de *Neisseria*.

1.5. Sensibilités aux antibiotiques

Le traitement du gonocoque ne peut être conduit de manière rationnelle que si la sensibilité du germe aux antibiotiques est connue. Durant les deux dernières décennies, la sensibilité du gonocoque aux antibiotiques a diminué de façon marquée. Plusieurs chercheurs ont rapporté l'existence d'une base commune à cette multirésistance. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Centre de Contrôle des Maladies et de la Prévention ne cessent de multiplier les efforts dans la lutte contre cette maladie. Ils proposent des lignes thérapeutiques et des programmes d'éducation sanitaire. Étant

donné que la sensibilité de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques est variable en fonction de l'origine géographique ou raciale et que l'échec thérapeutique est souvent dû à la présence de souches relativement résistantes, il est donc important de connaître le profil de sensibilité de ce microorganisme pour les raisons thérapeutiques et aussi pour des raisons épidémiologiques.

Par comparaison à d'autres bactéries à gram négatif, le gonocoque est reconnu à être sensible de façon intrinsèque aux agents antimicrobiens. Cependant, il s'est installé un processus de sélection graduelle des mutants résistants par la pression sélective exercée par des antibiotiques utilisés dans la thérapeutique. Actuellement dans certaines régions, l'utilisation de certains antibiotiques est proscrite. Ceci est attribué à la résistance plasmidique (extrinsèque) et/ou chromosomique (intrinsèque). La résistance chromosomique touche plusieurs antibiotiques alors que la résistance à médiation plasmidique est limitée à la pénicilline et à la tétracycline.

1.5.1. La pénicilline

Au début de l'ère des antibiotiques, l'utilisation de la pénicilline a été un traitement de choix de la gonorrhée. Les souches isolées dans les années 1940 étaient inhibées par des concentrations de 0,01 µg/ml. Mais après 10 ans d'utilisation, des souches moins sensibles sont apparues. Reyn et coll., (1958) ont rapporté que 17% des souches isolées étaient modérément résistantes à la pénicilline. Depuis lors, une augmentation graduelle de la résistance due à l'accumulation de mutations de type

chromosomique a été observée. Cependant l'antibiotique est demeuré actif et utilisable pour le traitement de la maladie. Ce type de résistance reste d'un grand intérêt depuis l'apparition des épidémies ces dernières années (Faruki et coll., 1985).

En 1976, l'apparition des souches résistantes productrices de β -lactamase (résistance plasmidique) a réduit de façon drastique l'efficacité de la pénicilline dans le traitement de l'infection gonococcique. Cette résistance constitue actuellement un véritable problème dans plusieurs pays où le nombre de souches résistantes est en augmentation constante (Whittington et Knapp, 1988). Dans certains pays cette résistance aurait, selon Lind (1990) et Whittington et Knapp (1988) un caractère épidémique. Pour ces raisons la pénicilline devrait être rarement utilisée pour le traitement de la gonorrhée, surtout dans les pays en voie de développement qui constituent une réserve épidémiologique des souches relativement résistantes isolées en proportions élevées.

1.5.2. La tétracycline

Actuellement une proportion importante des souches gonococciques se révèle peu sensible à la tétracycline. La résistance à la tétracycline a également augmenté au cours des dernières années.

Elle est due à l'apparition d'un plasmide de 25,2 MDa, lequel détermine un niveau de résistance très élevé (CMI > 16 μ g/ml).

Le premier cas de résistance plasmidique à cet antibiotique a été identifié au New Hampshire en 1982 (Anonymes, 1985). L'ensemble de toutes les données publiées jusqu'à présent démontre que la plus haute résistance à la tétracycline observée dans plusieurs pays est attribuée à des mutations chromosomiques et/ou à la présence des plasmides. Aux États-Unis, cette résistance est principalement rencontrée à Philadelphie et à Baltimore (Anonymes, 1990 ; Schawarcz et coll., 1990).

Des études ont rapporté de 1985 à 1986 des épidémies causées à la fois par des souches résistantes par médiation plasmidique à la pénicilline et à la tétracycline. Depuis les premiers cas, ces souches sont devenues de plus en plus prévalentes. Cette tendance peut être un reflet de la réponse du microorganisme à l'utilisation massive de la tétracycline dans le traitement des infections à gonocoques en concomitance avec le *Chlamydia*. Schawarcz et coll., (1990) ont démontré que les souches de *N. gonorrhoeae* qui présentaient une résistance de type chromosomique à la pénicilline et à la tétracycline, seraient aussi résistantes à la céfoxitine.

1.5.3. Spectinomycine

Dans plusieurs régions la spectinomycine est devenue le médicament de choix pour le traitement des infections à PPNG. Malgré ses concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées (16-32 µg/ml), la spectinomycine est utilisée avec succès en dose unique dans le traitement de la gonorrhée causée par les souches PPNG et les souches résistantes à la tétracycline de *N. gonorrhoeae*. Elle n'est pas active contre les

infections pharyngées. Cependant, elle est recommandée pour les infections uro-génitales et anales. La spectinomycine est mieux perçue pour les patients allergiques à la pénicilline et aux céphalosporines.

Les premières souches résistantes à la spectinomycine ont été rapportées par Ashfort et coll., (1981). Les souches résistantes à la spectinomycine demeurent rares, quoiqu'une éruption soit apparue en Corée et aux Royaumes-Unis (Ison et coll., 1983) où la spectinomycine a été amplement utilisée pour le traitement de la gonorrhée. Aux États-Unis cette résistance est encore rare (Zenilman et coll., 1987). La résistance à la spectinomycine peut coexister avec la résistance de type plasmidique et/ou chromosomique à d'autres antibiotiques (Ison et coll., 1983).

1.5.4. Ceftriaxone

La plupart des céphalosporines de la première génération sont moins actives sur les gonocoques que la pénicilline G. Les souches relativement résistantes à la pénicilline le sont aussi à ces céphalosporines.

La ceftriaxone, une céphalosporine de troisième génération, est actuellement recommandée comme traitement de choix dans la thérapie de la gonorrhée dans toutes les régions géographiques. Elle est administrée en dose unique et généralement bien tolérée par les patients. Elle est aussi très efficace dans le traitement des infections non compliquées (Moran et Zenilman, 1990). Jusqu'à présent la résistance à la ceftriaxone, et

aux autres céphalosporines de troisième génération n'a pas été rapportée chez le gonocoque, même dans les pays où elle est amplement utilisée (Clendennen, 1992). Cependant, Sarasua et coll., (1990) ont noté une diminution de la sensibilité chez les souches possédant une résistance élevée à d'autres antibiotiques. Cette baisse de sensibilité est plus accentuée parmi les souches avec une résistance chromosomique à la tétracycline et à la pénicilline par rapport à celles ayant uniquement une résistance plasmidique aux deux antibiotiques. Récemment, une autre céphalosporine de troisième génération (cefixime), a été rendue disponible dans certains pays. Les premiers rapports sur son efficacité viennent des pays où les souches de gonocoque ont une résistance très élevée à la pénicilline. Son efficacité est comparable à celle de la ceftriaxone (Handsfield et coll., 1991; Plourde et Coll., 1992).

1.5.5. Autres antibiotiques

Le thiamphénicol a été utilisé avec succès dans le traitement de la gonococcie en France (Siboul et coll., 1972) et en Afrique (Latif et coll., 1986) pendant plusieurs années. On a observé une forte corrélation positive entre la résistance chromosomique et celle du thiamphénicol. La propagation de la résistance des souches à la pénicilline indiquerait également une progression des souches moins sensibles au thiamphénicol. Par conséquent, ceci implique un risque croissant d'un échec de thérapie au thiamphénicol (Lassau et coll., 1987; Bogaerts et coll., 1987).

La résistance aux fluoroquinolones apparaît aussitôt après l'introduction de la première génération de quinolone (Harrison et coll, 1984; Inga Lind, 1997). L'utilisation abusive des fluoroquinolones dans certaines régions a provoqué une augmentation des CMI's chez *N. gonorrhoeae* à Hong Kong et la République de Philippines où 10% des souches sont résistantes. En Amérique du Nord 50% de souches ont une sensibilité décroissante aux quinolones (Knapp et coll., 1997). Cette résistance a provoqué la résistance chez d'autres espèces bactériennes (Joyce et coll., 1988).

Cependant, les fluoroquinolones et les quinolones de premières générations peuvent encore être utilisées chez les patients allergiques à la pénicilline. Par contre, elles ne sont pas recommandées chez les femmes enceintes et les adolescentes.

Le céfotétan, une céphalosporine de deuxième génération, possède un large spectre d'activité antimicrobienne. Celui-ci présente une meilleure activité *in vitro* chez les souches de *N. gonorrhoeae* avec une résistance plasmidique que chez les souches possédant une résistance de type chromosomique (Jones, 1991).

Le céfotétan est recommandé par le CDC dans le traitement de la maladie inflammatoire (Moran et Zenilman, 1990). Plusieurs agents antimicrobiens tels que la doxycycline, l'érythromycine, l'azactam, et l'aztréonam sont également utilisés dans le traitement de la gonorrhée. L'utilisation de l'aztréonam est plus limitée.

1.6. Déterminants et facteurs de résistance aux antibiotiques

Les facteurs de résistance aux antibiotiques chez le gonocoque sont situés sur les chromosomes, les plasmides et les transposons. Ces deux derniers sont surtout impliqués dans la dissémination de la résistance.

Les plasmides sont des ADN bicaténaires, circulaires et extra chromosomiques. Ils sont de tailles variables et capables de se multiplier de façon autonome. Ils sont porteurs de gènes supplémentaires généralement non essentiels à la survie du microorganisme hôte. Initialement, ils ont été identifiés chez *Escherichia coli*. Ils sont adaptés pour servir d'agents d'évolution génétique et de dissémination des gènes de la résistance. Ils permettent le transfert d'autres gènes qui peuvent modifier le phénotype de la bactérie réceptrice, en lui apportant des modifications au niveau des fonctions métaboliques (Foster, 1983). Chez *N. gonorrhoeae* les plasmides peuvent être classés selon le rôle qu'ils jouent dans les cellules. On distingue donc trois catégories de plasmides: les plasmides conjugatifs, le plasmide cryptique et les plasmides de résistance.

1.6.1. Plasmide conjugatif

En 1940, un plasmide conjugatif de 24,5 MDa a été identifié chez *N. gonorrhoeae* dans des régions géographiques délimitées (Robert et coll., 1979). Ce plasmide de conjugaison est capable de réaliser son propre transfert. Il permet aussi le transfert de gènes chromosomiques et plasmidiques, qui déterminent la production de l'enzyme β -

lactamase. Ce transfert est fait avec efficacité entre souches de *N. gonorrhoeae* et entre *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* ou à d'autres espèces (Ikeda et coll., 1986). Le plasmide conjugatif est souvent considéré comme étant le principal disséminateur de la résistance puisqu'il facilite le transfert des plasmides de résistance.

Le plasmide de 24,5 MDa, n'est pas responsable en soi de la résistance aux antibiotiques, mais l'insertion du gène *tetM* introduit la résistance à la tétracycline. Le plasmide 25,2 MDa, qui détermine la résistance à la tétracycline, accomplit les mêmes fonctions que le plasmide de 24,5 MDa. Le grand pouvoir de dissémination de ces deux plasmides les rend responsables des conséquences au niveau de l'épidémiologie de la résistance aux agents antimicrobiens. Les souches les plus aptes à recevoir les plasmides β -lactamases sont celles qui possèdent le plasmide conjugatif. (Robert et Falkow, 1977).

1.6.2. Plasmide cryptique

On trouve chez *N. gonorrhoeae* un plasmide cryptique (sans aucune fonction connue) d'un poids moléculaire 2,6 MDa, on le retrouve dans 100% des souches (Falk et coll., 1988; Palomares et coll., 1990). Miller et coll., (1982) suggèrent qu'il puisse être lié à la résistance à la vancomycine. Ce plasmide n'a pas été trouvé parmi les souches sensibles à la vancomycine, et aucun autre chercheur n'a encore confirmé cette relation. L'utilisation de la vancomycine dans les milieux d'isolement de *N. gonorrhoeae* réduit les possibilités d'obtenir de souches sensibles, et de pouvoir confirmer cette relation entre les souches sensibles et l'absence de ce plasmide. Plusieurs autres plasmides ont été trouvés:

un plasmide de 7,8 MDa a été isolé chez des souches PPNG et non-PPNG (Odugbemi et coll., (1983), Palomares et Coll., (1990)). Aucune fonction n'a été associée à ces nouveaux plasmides.

1.6.3. Plasmide de résistance à la pénicilline

La découverte aux Philippines d'une souche de PPNG, a été signalée en 1975 (Siegel et coll., 1977). En 1976, une souche PPNG a été décelée aux Etats-Unis par Ashford et coll., (1976) D'autres cas furent rapportés en Angleterre à cette époque (Phillips, 1976; Percival et coll, 1976; Turner et coll, 1976). A Liverpool, très vite le nombre de souches de PPNG s'est élevé à 9% (Turner et coll., 1976).

Depuis lors, des cas de PPNG ont été découverts dans plus de 15 pays parmi lesquels se trouvent la Hollande (Blog et coll., 1977), la Norvège (Odegaard et coll., 1976), la Belgique (Piot, 1977), l'Afrique du Sud (Hallett et coll., 1977). Plusieurs études ont démontré clairement que l'Afrique Orientale constituait une autre source de souches PPNG. L'enzyme responsable de cette résistance à la pénicilline est une β -lactamase de type TEM-1 apparentée à celle isolée chez *Haemophilus spp* et chez les entérobactéries. Cet enzyme, possède une forte activité contre les benzylpénicillines et les céphalosporines (Brunton et coll., 1986).

Deux plasmides génétiquement différents ont été isolés, l'un de 4,4 MDa pour les souches du Sud-Est asiatique et l'autre de 3,2 MDa pour les gonocoques d'origine anglaise et Est-africaine (Perine et coll., 1977; Robert et coll., 1977). Ces plasmides

contiennent tous deux une importante quantité d'ADN transposable correspondant à une séquence *TM2*. Cette séquence constitue un code, pour la résistance à l'ampicilline. Elle est transférable aux entérobactéries et à l'*H. influenzae* (Elwell et coll., 1977). A la différence du plasmide de type asiatique, le plasmide de type africain n'a pas été associé immédiatement au plasmide conjugatif (Brunton et coll., 1986). Il semble que la dissémination des souches porteuses du plasmide de 3,2 MDa est plus limitée que celles possédant le plasmide de 4,4 MDa. Ces dernières souches sont fréquemment associées au plasmide conjugatif de 24,5 MDa (Falk et coll., 1988; Palomares et coll., 1990).

La prévalence du plasmide de 3,2 MDa a diminué au cours de ces dernières années dans certains pays, même si les souches transportent occasionnellement le plasmide conjugatif de 24,5 MDa (Ison et coll., 1990). Selon Ison et coll., (1986) cette différence est due à une liaison instable entre le plasmide conjugatif et le plasmide de 3,2 MDa. Knapp et coll., (1986) ont montré que ce plasmide pouvait se perdre rapidement en laboratoire lors des passages dans des milieux non sélectifs.

A partir des souches isolées de patients ayant acquis l'infection à Rio de Janeiro et en Afrique du Sud, Van Embden et coll., (1985) ont identifié un plasmide de 2,9 MDa (type Rio) codant pour une β -lactamase.

Un plasmide de 3,05 MDa (type Toronto) codant pour une β -lactamase a été décrit au Canada par Yeung et coll., (1986) ; et par la suite au Japon, à Taiwan, à

Singapour, aux Philippines et aux États-Unis par Sarafian et coll., (1990); le même plasmide a été trouvé en Grèce par Tzanakaki et coll., 1989. Gouby a décrit un autre plasmide de (4,0 MDa) à Nîmes en 1982.

Un autre plasmide de 6,5 MDA qui code pour la production de l'enzyme β -lactamase a été rapporté en Nouvelle-Zélande (Breatt, 1989). Dans leur rapport, il s'agit d'un plasmide instable dans des milieux non sélectifs.

Pariser et coll., (1982) démontrent que, chez le gonocoque l'élimination des plasmides codant pour la résistance à la pénicilline pourrait s'effectuer rapidement en absence de la pression sélective exercée par cet antibiotique. Par contre, d'autres facteurs de résistance peuvent émerger comme conséquence des nouvelles transpositions ou des délétions qui seront facilement disséminées. Ce qui donne l'aptitude aux plasmides conjugatifs de se propager parmi les espèces de *Neisseria* et d'autres microorganismes.

1.6.4. Plasmide de résistance à la tétracycline

Un plasmide de 25,2 MDa codant pour une résistance élevée à la tétracycline (>16 $\mu\text{g/ml}$) peut être présent chez *N. gonorrhoeae*. *TetM*, est le gène responsable de cette résistance. Il se localise dans un transposon similaire à celui des streptocoques. Ce plasmide retrouvé aussi chez *N. meningitidis*, peut réaliser le transfert conjugatif des plasmides de β -lactamase de *N. gonorrhoeae* vers *N. meningitidis* et vers d'autres espèces de *Neisseria* (Robert et coll., 1988).

Le plasmide de 25,2 MDa a une double fonction (résistance et conjugaison), ce qui suggère que les souches porteuses puissent disséminer la résistance plasmidique dans la nature, chez les *Neisseriaceae* et chez d'autres espèces pathogènes. Cette caractéristique lui confère une grande importance épidémiologique. Morse et coll., (1986) montrent que le déterminant *TetM* peut être transféré à des souches sensibles qui possèdent le plasmide de 24,5 MDa par transformation.

1.6.5. Origine des plasmides de résistance à la pénicilline et à la tétracycline

Le gène de résistance à la tétracycline *tetM* est localisé dans un transposon présent chez certaines bactéries à Gram négatif et Gram positif. La provenance du déterminant *tetM* chez les gonocoques n'est pas encore bien identifiée. On retrouve également le même gène chez d'autres pathogènes génitaux coexistant avec les gonocoques, à savoir les streptocoques, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* et *Garnerella vaginalis* (Morse et coll., 1986). Il est aussi possible que le déterminant *tetM* soit associé au plasmide original par une recombinaison dans des cas autres que la transposition (Gascoyne et coll., 1990). Il existe une homologie entre le plasmide 24,5 MDa et celui de 25,2 MDa qui a été retrouvé chez des souches de gonocoques isolées en Hollande. Cette homologie suggère que le plasmide de 25,2 MDa résulte de l'insertion du transposon *tetM* dans le plasmide de 24,5 MD (Morse et coll. 1986).

Des analyses moléculaires effectuées sur les plasmides provenant des souches des États-Unis, de la Hollande et de la Grande-Bretagne ont démontré que ceux-ci diffèrent

malgré qu'ils soient porteurs du déterminant *tetM* et ont un poids moléculaire similaire (Gascoyne et coll., 1991). Il est donc question de deux types de plasmides produits dans des circonstances génétiquement différentes.

Un rapport fait par Jahn et coll., (1985) mentionne la présence d'un plasmide de 10,5 MDa associé à la résistance à la tétracycline en Allemagne, cependant d'autres publications démontrant la présence de ce plasmide dans d'autres régions géographiques n'ont pas été rapportées. Il est fort probable que les plasmides codant pour la β -lactamase chez les gonocoques auraient été transmis par conjugaison avec des espèces de la famille *Haemophilus*. McNicol et coll., (1983) et Brunton et coll., (1982) ont fait des études moléculaires des souches d'*H. ducreyi* et *N. gonorrhoeae*. Celles-ci démontrent que *H. ducreyi* contient le transposon Tn2 complet ainsi que les plasmides de 7 et 5,7 MDa codant pour la production de β -lactamase. Cependant, les gonocoques produisant la β -lactamase possèdent 40% du transposon original. De ces études on peut conclure que les plasmides des deux espèces sont identiques et que la différence se trouve au niveau de la séquence incomplète du transposon *TnA*. Selon McNicol et coll., (1983) cette différence est due à une perte avant ou pendant le transfert conjugatif. D'autres études ont démontré que la différence entre les plasmides de 3,4 et 4,7 MDa chez les gonocoques est due à l'insertion d'une séquence de 1,3 MDa présente aussi chez *H. ducreyi*.

Il a été démontré qu'une délétion de 100 paires de bases du plasmide de la souche de Toronto est à l'origine de celui de la souche de Rio. Par contre une relation possible de ces plasmides avec le plasmide de la souche de la Nouvelle-Zélande n'a pas été mise

en évidence. Les souches Toronto et celles de Rio sont dérivées de la souche asiatique (Dillon et coll., 1986).

1.6.6. Mutations

Une faible résistance à divers antibiotiques, dont la tétracycline, le chloramphénicol et l'érythromycine, s'est développée en même temps qu'une faible résistance à la pénicilline (Sparling et coll., 1977). Cette observation suggérait à l'époque que la résistance multiple pouvait être causée par une modification de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire. Il a été montré, par la suite, que les gènes codant pour la résistance à la streptomycine, à la spectinomycine, à la tétracycline et au chloramphénicol sont liés (Morse, 1979). Dans le cas des antibiotiques agissant au niveau de la synthèse protéique, la résistance est probablement due à une altération des ribosomes (Sparling et coll., 1977). Il semble qu'une protéine de la sous-unité 30s du ribosome soit altérée lors de la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine (Morse, 1979).

Différents niveaux de sensibilité à plusieurs agents antimicrobiens se retrouvent chez des souches cliniques de *N. gonorrhoeae*. La résistance chromosomique, considérée de bas niveau par rapport à la résistance plasmidique, est la conséquence de mutations au niveau du chromosome bactérien.

Les loci *penA*, *penB* et *mtr* (multiple transformable résistance) ont été impliqués dans la résistance à la pénicilline. L'expression phénotypique de la mutation *penA* est une

réduction d'affinité de la PCP2 pour la pénicilline (Sparling et coll., 1975; Dougherty et coll., 1980). Cette mutation est aussi responsable de la diminution de la sensibilité aux céphalosporines de deuxième et de troisième génération (Dougherty et coll., 1981).

Le locus *penB*, dont la fonction reste inconnue est attaché au gène *por* qui code pour la porine majeure du *N. gonorrhoeae*. Les mutations dans ce gène modifient la perméabilité de la paroi cellulaire à la pénicilline. Celle-ci code aussi pour une résistance moindre à la tétracycline (Cannon et Sparling, 1984), mais elle n'est pas décelée lorsqu'elle se présente seule; par contre, associée au locus *mtr*, elle peut être décelable (Sparling et coll., 1975).

Le locus *mtr* est un opéron. Il confère, en modifiant la composition de la membrane externe (Guymon et coll., 1978) la résistance à la pénicilline, à la tétracycline, à l'érythromycine, au chloramphénicol, à la rifampicine, à l'acide fusidique, à divers colorants, détergents et/ou acides gras (Sparling et coll., 1975). Il augmente aussi l'expression phénotypique du locus *cml* codant pour la résistance au chloramphénicol (Maier et coll., 1975). La mutation *mtr* se rencontre fréquemment chez les souches isolées lors d'infections anales.

Une troisième mutation du locus *tet* est responsable d'un faible niveau de résistance à la tétracycline (Sarrubi et coll., 1974). La mutation *spc* est fréquente dans les régions où la spectinomycine est utilisée pour traiter la gonorrhée. La modification du gène entraîne des altérations au niveau de la sous-unité 30s du ribosome, le site d'action de l'antibiotique.

Les gonocoques sont parfois résistants à des antibiotiques non utilisés habituellement pour traiter la gonorrhée. Les loci *str* et *rif*, impliqués dans la résistance à la streptomycine et à la rifampicine, respectivement, sont associés au locus *tet* (résistance à la tétracycline). Selon Warner et coll., (1980), l'action combinée de ces mutations chromosomiques est déterminante dans la résistance aux autres antibiotiques.

Des mutations des loci *env* et *mom* induisent une augmentation de la susceptibilité à plusieurs antibiotiques. Ce phénomène est dû à des modifications de la perméabilité membranaire (Faruki et Sparling, 1986; Morse, 1979). L'insertion d'un des gènes mutés (*env* ou *mom*) chez des souches qui possèdent le locus *mtr* résulte en la suppression des effets de ce dernier. Sarrubbi et coll., (1975) rapportent que la mutation *env* semble se retrouver fréquemment chez les souches cliniques. La mutation dans le gène *env* pourrait expliquer l'occurrence de souches incapables de croître sur le milieu sélectif Thayer-Martin. Étant donné, que cette mutation augmente la sensibilité à la vancomycine (Sparling et coll., 1977). Ces mutations sont responsables de l'hypersensibilité à l'érythromycine chez les gonocoques (Koelbl et Catlin, 1986).

Les souches porteuses de ces mutations sont la cause des problèmes du point de vue épidémiologique. Elles ne sont pas diagnostiquées dans les laboratoires où la vancomycine est ajoutée dans les milieux de culture. Ainsi l'infection n'étant pas décelée les patients demeurent des agents disséminateurs de ces souches.

Les souches cliniques de *N. gonorrhoeae* présentent fréquemment des mutations au niveau des voies métaboliques qui sont responsables de la dépendance à certains

métabolites (Shinner et Catlin, 1982). La propagation de ces mutations s'effectue chez les gonocoques via la transformation (Sarrubi et Sparling, 1974). Les souches porteuses de la mutation *mtr* ont une perméabilité diminuée, une augmentation quantitative d'une protéine de la membrane externe et un degré élevé de transpeptidation (Morse et coll., 1980).

1.6.7. Transposons

Les transposons sont d'importants déterminants génétiques au niveau de la résistance aux agents antimicrobiens. Contrairement aux plasmides, les transposons sont des éléments de taille et de structure variables. Ils sont incapables de multiplication autonome mais capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon à un autre. Cette translocation s'effectue à des fréquences variables, en absence d'homologie entre les ADNs qui interagissent et indépendamment du système *recA* de la bactérie hôte.

La transposition peut s'effectuer sur un réplicon donné ou sur tous les réplicons à des nombreux endroits. Les transposons sont constitués d'un ou plusieurs gènes. Ces gènes peuvent être impliqués dans la résistance. Ils jouent un rôle très important dans l'évolution des plasmides de résistance *in vivo*. Ils contribuent également à la dissémination de gènes de résistance entre plasmides et chromosomes des bactéries d'une même espèce, ainsi que d'espèces et de genres différents (Brunton et coll., 1986). Là où les plasmides ne peuvent se maintenir de façon stable, les bactéries réceptrices pourraient acquérir un caractère de résistance.

1.7. Échange génétique

Les ADN chromosomique et plasmidique contiennent l'information nécessaire à l'expression des fonctions vitales et spécifiques des microorganismes. Trois mécanismes naturels contribuent à l'échange de ce matériel chez les bactéries: la conjugaison, la transformation et la transduction. Chez les bactéries à gram négatif, la conjugaison semble être le moyen de dissémination le plus utilisé. Par contre chez *N. gonorrhoeae*, la transformation et la conjugaison sont importantes. La transduction n'a pas encore été observée chez les gonocoques.

7.1. Transformation

C'est le processus selon lequel une bactérie réceptrice, dite compétente incorpore directement l'ADN chromosomique présent dans le milieu. Cet ADN peut provenir d'autres bactéries lysées. Les gonocoques ont une faculté exceptionnelle à la compétence qui semble être constitutive. Chaque cellule est compétente dans toutes les étapes de la croissance que ce soit dans un milieu pauvre ou enrichi (Biswas et coll., 1977). Le mécanisme de transformation semble être étroitement relié avec la présence des pili. Noland et coll., (1979) ont démontré que l'état de compétence augmente avec la présence du plasmide de 24,5 MDa. L'expression phénotypique de la compétence *in vitro* nécessite seulement le glucose comme source d'énergie et des cations (Mg^{2+} ou Ca^{2+}). Par contre l'ajout des cations monovalents (Na^+ et K^+) peut accélérer le taux de mortalité des bactéries (Biswas et coll., 1977).

Les gonocoques sont hautement autolytiques et très compétents *in vivo*. Janik et coll., (1976) ont réalisé des études sur l'ADN obtenu par lyse des cellules prélevées chez des patients atteints de gonorrhée. Celles-ci montrent qu'ils sont biologiquement capables d'initier la transformation *in vivo*. Ces données suggèrent que la transformation soit le principal mécanisme d'échange génétique. Chez les gonocoques et d'autres espèces de *Neisseria*, il doit y avoir homologie entre les ADNs pour que la transformation se réalise. Les gonocoques compétents posséderaient à leur surface des récepteurs. Ces récepteurs reconnaissent des séquences de nucléotides. Ces dernières sont fréquentes dans l'ADN homologue, mais rares dans l'ADN hétérologue (Graves et coll., 1982).

1.7.2. Conjugaison

La conjugaison est le mécanisme qui requiert l'établissement d'un contact physique entre les cellules afin de réaliser le transfert d'ADN. La conjugaison chez les gonocoques est contrôlée par les plasmides conjugatifs. Chez les bactéries à gram négatif, la présence de pili est essentielle à la reconnaissance de la cellule réceptrice et à la formation d'un pont entre les deux cellules. Les plasmides conjugatifs de 24,5 et 25,2 MDa de *N. gonorrhoeae* permettent leur propre transfert de même que celui des plasmides codant pour la production de β -lactamase. Ceux-ci sont incapables d'autotransfert. Robert et Knapp, (1988) observent le même phénomène entre les souches de *N. gonorrhoeae*, et aussi de *N. gonorrhoeae* vers *N. méningitidis* aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Le transfert des plasmides de la résistance peut se réaliser *in vivo* par l'intermédiaire des plasmides

Dorward et coll., (1989) ont identifié une structure membranaire en forme de vésicule (bleb), parmi les souches de gonocoque. Ils ont conclu que celle-ci pourrait avoir un rôle important dans l'échange génétique lors de la conjugaison *in vivo* ou *in vitro*.

1.8. Manifestations cliniques de l'infection gonococcique

1.8.1. Infection gonococcique

La gonorrhée peut se manifester de diverses manières. Une infection non compliquée implique une invasion des surfaces muqueuses des voies urogénitales. Cette invasion est suivie d'une destruction au niveau de l'épithélium local. Ceci est une réponse à une inflammation qui, par la suite conduit éventuellement à des écoulements purulents. Après une première infection les chances de réinfections varient de 35% chez les hommes (Britigan et coll. 1985). Chez les femmes, ce risque s'élève à 60% (Wright et Daunt 1973). Alternativement la maladie peut devenir plus envahissante, produisant des infections asymptomatiques. Elle peut également devenir plus préjudiciables en causant des infections disséminées. Les sujets demeurent infectants pour ces partenaires sexuels et sont indubitablement un réservoir majeur pour l'infection. L'infection locale et symptomatique pourrait devenir disséminée, conduisant ainsi à une urétrite, à une dermatite et très rarement à une méningite.

Chez les femmes, l'infection disséminée peut conduire à une salpingite. Une salpingite non traitée peut conduire à l'éclatement des trompes de Fallope et

éventuellement à la stérilité. Cependant la maladie inflammatoire pelvienne est moins fréquente dans les pays industrialisés (Weström 1975). Dans les pays en voies de développement la maladie inflammatoire pelvienne serait la cause de la stérilité pour la majorité des femmes.

1.8.2. Infection gonococcique non compliquée

L'infection par le gonocoque survient en deux phases: la première est l'attachement à la muqueuse et la seconde est l'invasion des cellules épithéliales. L'étape initiale de l'attachement entraîne le gonocoque en premier et ensuite les cellules épithéliales dans une enceinte fermée. Cet attachement survient très rapidement après l'infection. L'absence de processus d'attachement peut conduire à des infections symptomatiques subséquentes. La surface antigénique du gonocoque, au préalable les pili (Punsalang et Sawyer, 1973) et la protéine II (Lambden et coll., 1979), favorisent cet attachement aux cellules humaines. Le niveau d'attachement détermine la spécificité de la maladie, ceci est dû au fait que le gonocoque n'adhère pas aux cellules non muqueuses. La colonisation des couches subépithéliales survient à travers l'invasion des cellules épithéliales, et non la jonction entre elles (Watt et Coll., 1980). A la deuxième phase, le gonocoque s'attache aux microvilli des cellules épithéliales. Celles-ci se rétractent et attirent le gonocoque à travers la surface de la cellule. D'autres microvilli enveloppent et emprisonnent la bactérie. C'est un mécanisme similaire à celui de la phagocytose par les leucocytes polymorphonucléaires. Les vésicules migrent à la base de la cellule où le nombre de gonocoque par vésicule s'accroît. Après cette étape, les vésicules libèrent le

gonocoque à l'intérieur de l'espace subépithélial. A la suite de cette invasion, les cellules épithéliales deviennent désorganisées et se desquament. Ceci provoque une réponse inflammatoire locale, produisant un grand nombre de leucocytes polymorphonucléaires qui entrent aussi dans l'espace subépithélial.

Plusieurs de ces cellules traversent les membranes de l'épithélium et produisent une décharge symptomatique caractéristique de la maladie. À côté des invasions physiques, d'autres facteurs surviennent endommageant les cellules hôtes. La muqueuse des trompes de Fallope est constituée de 60-80% de cellules ciliées. Le gonocoque adhère sélectivement aux cellules non ciliées, et aux protéines de la membrane externe. Ceci lui permet d'induire l'enlèvement de ces cellules. Quelques heures après l'attachement du gonocoque aux cellules épithéliales, l'activité ciliaire est réduite et disparaît à la surface muqueuse. Cette capacité permet au gonocoque d'envahir la muqueuse. Le détachement des cellules ciliées semble être induit par les lipopolysaccharides. Les lipopolysaccharides sont libérés sous forme de bulles au niveau de la membrane externe durant l'évolution de la gonococcie. La réponse des anticorps à ces infections produit des anticorps IgG et IgA. Ces anticorps vont inhiber l'attachement mucosal, et arrêter ainsi toute infection future. Ceci explique la courte durée des infections symptomatiques.

1.8.3. Maladie inflammatoire pelvienne

Environ 10 à 15% des femmes ont une gonorrhée urogénitale, qui se développe en une maladie inflammatoire pelvienne. C'est une infection des trompes de Fallope et d'autres structures retrouvées dans la région pelvienne, telles que les ovaires. Des études ont montré que certains microorganismes autres que le gonocoque pouvaient causer des maladies inflammatoires pelviennes. La présence du gonocoque dans la région pelvienne provoque une réponse inflammatoire des trompes de Fallope (salpingite) et d'autres tissus environnants (McGee et coll, 1984).

Draper et coll., (1980) ont noté que lors d'une salpingite il y a une destruction de la muqueuse et une perte de l'intégrité structurale associée au processus inflammatoire. Le gonocoque adhère au sperme et s'attache à travers le mucus cervical. Ce processus est aidé par les pili. Le mucus cervical agit comme une barrière potentielle au passage bactérien. Plusieurs étapes de la maladie inflammatoire pelvienne se produisent durant ou peu avant la menstruation, lorsque cette barrière a plus de perméabilité aux bactéries. Cette phase dans le cycle pourrait aussi générer un processus infectieux. Une fois le gonocoque arrive aux trompes de Fallope, l'invasion de l'épithélium mucosal commence. Le gonocoque isolé lors des menstruations est de phénotype transparent (PII). Habituellement, lorsque le gonocoque est isolé dans d'autres sites, il montre une morphologie mixte, à la fois transparente et opaque. Le phénotype transparent réduit les interactions entre le gonocoque et les neutrophiles dans le sang lors des menstruations, en évitant le mécanisme de défense de l'hôte.

Dans les pays industrialisés, l'incidence de la maladie inflammatoire pelvienne est très faible, mais continue à causer de sérieux problèmes, économiques en particulier. L'usage des contraceptifs oraux réduit et prévient vraisemblablement les maladies inflammatoires pelviennes. Par contre les moyens intra-utérins n'ont pas le même effet sur l'incidence de la maladie et peuvent conduire à une aggravation. Cette maladie peut entraîner de graves complications dont la stérilité, des infections récurrentes, des douleurs pelviennes chroniques et des grossesses ectopiques (Sweet, 1981; McGee, 1984).

1.8.4. Infection gonococcique disséminée (IGD)

L'infection disséminée (ou gonococcémie) est une complication rare de la gonorrhée qui atteint généralement les femmes. Cette infection est provoquée par la dissémination du gonocoque chez l'organisme hôte où environ 1 à 3% des infections gonococciques deviennent disséminées. Les patients porteurs asymptomatiques risquent de développer une infection disséminée ou une infection pelvienne (1 à 10%). Les manifestations cliniques de cette infection s'expriment par deux symptômes majeurs. La première est la polyarthralgie au niveau des moyennes et petites articulations (articulations métatarso-phalangiennes, puis des poignets, des chevilles et des genoux), les douleurs dues à des lésions de téno-synovite et la dermatite (lésions typiques localisées surtout aux extrémités: doigts, orteils, paume des mains, plantes des pieds), et la deuxième est une arthrite purulente avec dermatite (Bowmer et coll., 1982). Occasionnellement, une méningite causée par le gonocoque peut présenter les symptômes classiques de méningite. Les infections arthritiques purulentes affectent normalement les

poignets ou les genoux. Au cours de ces infections, le gonocoque peut être isolé du liquide synovial.

L'enveloppe du gonocoque est une barrière majeure à l'activité bactéricide du serum humain. Ce qui explique la récurrence de méningite observée chez les patients avec certaines déficiences immunitaires. Cette activité bactéricide provient de l'action des anticorps dirigés contre les LPS. Toutefois les souches isolées des infections disséminées partagent des caractéristiques suivantes :

- une résistance à l'action bactéricide des sérums normaux humains (Cannon et coll., 1983; Hildebrandt et Buchanan, 1978). Cette résistance semble être causée par le manque d'antigènes déterminants sur le LPS, lequel est ciblé par les anticorps bactéricides. La résistance au sérum varie selon le site de l'infection;

- une sensibilité élevée à la pénicilline (Knapp et coll., 1978; O'Brien et coll., 1983; Schoolnik et coll., 1976);

- des besoins en arginine, hypoxanthine et uracile (AHU) pour la croissance (Knapp et coll., 1978; O'Brien et coll., 1983; Schoolnik et coll., 1976);

- la présence d'une protéine I d'un type particulier (Buchanan et Hildebrandt, 1981; Cannon et Buchanan, 1983);

- la formation de colonies exprimant principalement le phénotype transparent (James et Swanson, 1978). Cette dernière constatation indique que les gonocoques au phénotype transparent seraient plus invasifs.

1.9. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic basé exclusivement sur la clinique n'est pas fiable chez l'homme et souvent impossible chez la femme. Des examens paracliniques sont donc indispensables. Il n'y a pas de test sérologique fiable pour déceler l'infection à gonocoque. Le diagnostic doit donc être confirmé par culture du germe. Il doit être rapidement posé et le traitement initié le plus tôt possible, compte tenu du temps d'incubation court et du risque de contamination. Le patient non traité risque de présenter des complications (infection gonococcique disséminée).

Le diagnostic d'infection à gonocoque peut se faire dès la première consultation dans la majorité des cas (95% des hommes et jusqu'à 50% des femmes) sur la base de la coloration au gram. Ceci n'est pas le cas pour les prélèvements rectaux (flore contaminée) et pharyngés (présence de *Neisseria* non pathogènes). La mise en évidence de diplocoque gram négatif au niveau de l'urètre chez les patients de sexe masculin et symptomatique présente une haute sensibilité et spécificité. La sensibilité est beaucoup plus faible chez l'homme asymptomatique et chez la femme (Goodhart et coll., 1982).

Des alternatives à la coloration au gram sont actuellement proposées telles que l'ELISA, l'immunofluorescence et les sondes à ADN. Le test ELISA, qui consiste à une identification antigénique, a une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Mais, il est nettement plus coûteux et plus long que la coloration au gram. Sa faible spécificité chez la femme en limite l'usage même parmi les populations à haut risque. Les techniques

d'immunofluorescence donnent des résultats semblables. La culture de *N. gonorrhoeae* reste la technique la plus sensible.

1.10. Traitement

L'antibiothérapie constitue l'axe principal du traitement. En raison de la croissance très élevée des souches résistantes aux antibiotiques la CDC et l'OMS proposent de nouveaux schémas thérapeutiques basés sur l'utilisation des antibiotiques les plus récents (les céphalosporines de 3^{ème} génération, entre autres), et des programmes de surveillance.

Le choix de l'antibiotique approprié dépend de plusieurs facteurs: le traitement doit tenir compte des résistances, des allergies éventuelles des patients, de la possibilité d'une grossesse. Le traitement doit être facile à administrer, et soigner en même temps une éventuelle infection à *Chlamydia*.

En Europe le traitement recommandé pour les infections gonococciques non compliquées de l'urètre, de l'endocol et du rectum est le suivant: ceftriaxone 250 mg IM, spectinomycine 2 g IM (convient aux femmes enceintes et aux patients allergiques à la pénicilline) ou bien la ciprofloxacine 500 mg PO. Ces traitements sont associés à celui du *Chlamydia*: doxycycline 100 mg PO ×2/jour pendant 7 jours ou érythromycine 500 mg PO × 4/jour pendant 7 jours, par contre la ceftriaxone 250 mg IM est donnée avec l'érythromycine 500 mg × 4/jour.

En Amérique du Nord le CDC recommande soit la ceftriaxone (une dose de 125 mg par voie intramusculaire) ou la cefixime (une dose orale de 400 mg per os) ou l'une des fluoquinolones, soit la ciprofloxacine (une dose orale de 500 mg) ou l'ofloxacine (une dose de 400 mg) comme traitement de choix pour une infection gonococcique non compliquée. Comme autre traitement, on recommande la spectinomycine (une dose de 2 g par voie intramusculaire). De même en Amérique du Nord, tous ces schémas thérapeutiques contre la gonorrhée doivent être suivis d'un traitement contre le *Chlamydia trachomatis*: la doxycycline 100 mg, deux par jour pendant 7 jours ou l'azythromycine en une prise. Cependant, l'azythromycine n'est pas recommandée dans les cas d'urétrite ou de cervicite non gonococcique ou nonchlamydienne. La ciprofloxacine et l'ofloxacine ne sont pas recommandées pour les infections contractées en Asie du Sud-Est, notamment aux Philippines.

1.11. Épidémiologie

L'étude épidémiologie de *N. gonorrhoeae*, contrairement aux autres maladies, présente plusieurs difficultés. L'infection ne s'étend pas uniformément à travers les populations. L'âge, les pratiques sexuelles, le système de santé, les liens de parenté et la virulence des souches endémiques sont tous d'importants facteurs. Jusqu'à une époque récente, l'étude de la maladie a été empêchée par un sérotypage non effectif pour élucider les tendances de la gonorrhée. Les tendances nationales sont difficiles à comparer à cause de la variation dans la déclaration de la gonorrhée dans différents pays. En Grande-Bretagne et dans d'autres pays européens, la déclaration peut couvrir 90% de cas. Aux

États-Unis seulement environ 60% de cas de gonorrhée non compliquée sont rapportés à cause de l'automédication pratiquée par de nombreux patients. Dans les pays en voie de développement, les rapports sont inquiétants à cause des études limitées seulement aux petites populations. Plusieurs pays industrialisés ont les mêmes tendances dans l'incidence des infections à gonocoque.

Pendant la deuxième guerre mondiale, une incidence élevée a été enregistrée. Celle-ci a été suivie par une décroissance importante avec l'introduction du traitement par la pénicilline. Le nombre d'infections a lentement augmenté jusqu'au milieu des années 1960. Cette soudaine ascension est due au changement de l'éthique sexuelle. Cette croissance a atteint son sommet au début de 1970. Cependant le nombre de ces incidences a été relativement statique en Grande-Bretagne (16 à 24 ans).

Dans des études britanniques récentes, le nombre de cas dans la population mâle a clairement baissé. Ces changements soudains peuvent se justifier, par exemple chez les homosexuels à Detroit, où on observe une diminution de 39% de cas de gonorrhée. Ceci est probablement dû au changement dans le comportement sexuel de cette population pour éviter l'infection par le VIH. Au Canada le taux d'infections gonococciques a baissé de 62% entre 1990 et 1995 (Anonymes, 1997).

En Afrique et en Asie, la prévalence de l'infection gonococcique demeure élevée, les études font état d'incidences croissantes. Une étude de la gonorrhée dans une clinique de planification familiale à Nairobi, au Kenya a montré que 27% de célibataires et 17,5%

du total de femmes ont été infectés par le gonocoque. L'incidence de la gonorrhée en Afrique constitue un problème majeur de santé publique. Les maladies inflammatoires pelviennes et des problèmes urétraux chez les hommes, sont des causes importantes d'infertilité dans cette région. L'étude de l'incidence des souches de gonocoque a un intérêt particulier pour la recherche. En cherchant les sources de l'infection à gonocoques, un système effectif de caractérisation a été développé. Les procédures initiales à cette étude épidémiologique ont abouti à l'auxotypage. Ce système de typage de gonocoque est maintenant remplacé par le système de sérotypage.

Avant 1955 de très nombreux isolats de *N. gonorrhoeae* étaient devenus résistants à la pénicilline. Depuis ce temps, la résistance a graduellement augmenté. En 1969, le niveau de résistance a augmenté de 1% à 65%. Cette augmentation a été caractérisée par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) trop élevées dues à une thérapie inappropriée. Par ailleurs cette incidence élevée était due aux déterminants chromosomiaux. Ces résistances se sont répandues d'une façon significative dans le monde entier, non seulement avec la pénicilline, mais aussi la tétracycline et la spectinomycine. Rice et coll.,(1986) ont noté que la résistance à la pénicilline augmente avec celle de la tétracycline, de l'érythromycine, du triméthoprime-sulfaméthoxazole et du cefuroxime.

Les premiers isolats de *N. gonorrhoeae* produisant la β -lactamase ont été isolés aux Royaume-Unis en 1976. La résistance plasmidique à la pénicilline émergeait ainsi avec l'isolement des souches productrices de pénicillinase des patients infectés aux États-

Unis et en Afrique de l'Ouest (Phillips, (1976), Anonymes, (1976)). Les souches PPNG devinrent ainsi prévalentes à travers le monde (Johnson et Morse, (1988)) C'est cette émergence qui va clore l'époque de la pénicilline. Ces souches ont un plasmide de 3,2 MDa similaire aux isolats de l'Afrique de l'Ouest. Les souches en Amérique du Nord ont été associées à celles d'Asie. Elles ont un plasmide de 4,4 MDa. Celles-ci se trouvent en combinaison avec un plasmide conjugatif de 25,2 MDa. Ce dernier assure son autotransfert parmi les souches de gonocoque. Ce plasmide de transfert a été subséquemment trouvé en conjonction avec le plasmide de 3,2 MDa. D'autres plasmides moins connus ont été trouvés et dérivent généralement des plasmides de 3,2 et 4,4 MDa. L'analyse des séquences de ces plasmides montre une homologie avec la résistance aux antibiotiques des plasmides de *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, et *H. ducreyi*. Aux Royaumes-Unis les souches PPNG ont été analysées entre 1983 et 1986. Elles comptaient pour 10% de tous les cas enregistrés. Aux États-Unis, des observations similaires ont été rapportées à Miami, en Floride où 30% des souches étaient productrices de pénicillinase en 1986.

La résistance causée par un plasmide de transfert est aussi observée pour la tétracycline. Ce plasmide possède le déterminant *tetM* du streptocoque. Avec cette émergence de la résistance aux antibiotiques, il est important de développer des agents thérapeutiques efficaces.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Souches bactériennes

Un total de 80 souches cliniques de *N. gonorrhoeae* fait l'objet de cette étude. Trente provenant du Cameroun ont été isolées au Centre Pasteur de Yaoundé de 1995 à 1997. Les souches du Cameroun ont été partiellement identifiées au laboratoire du Centre Pasteur et conservées dans un milieu fourni par le Laboratoire de Santé Publique de Québec (LSPQ) (Harbec et Turcotte (1996)). Cinquante autres ont été isolées au Canada au laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) entre 1995 et 1998 (tableau I). Toutes ces souches ont été réidentifiées dans notre laboratoire de recherche et de développement (Dr Ravaoarino) du CHUM. La souche de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 a été utilisée comme contrôle dans les essais de sensibilité aux antimicrobiens.

Tableau 1 : Provenance des souches étudiées

Numéros de souches	Provenance
1YA, 2YA, 3YA, 4YA, 5YA, 6YA, 7GA, 8GA, 9GA, 10GA, 11GA, 12GA, 13GA, 14GA, 15GA, 16GA, 17GA, 18GA, 19GA, 20GA, 21GA, 22GA, 23GA, 24GA, 25GA, 26GA, 27GA, 28GA, 29GA, 30GA.	Cameroun : groupe B Centre Pasteur de Yaoundé
1HD, 2HD, 3HD, 4HD, 5HD, 6HD, 7HD, 8HD, 9HD, 10HD, 11HD, 12HD, 13HD, 14HD, 15HD, 16HD, 17HD, 18HD, 19HD, 20HD, 21HD, 22HD, 23HD, 24HD, 25HD, 26HD, 27HD, 28HD, 29HD, 30HD, 31HD, 32HD, 33HD, 34HD, 35HD, 36HD, 37HD, 38HD, 39HD, 40HD, 41HD, 42HD, 43HD, 44HD, 45HD, 46HD, 47HD, 48HD, 49HD, 50HD.	Canada : groupe A Hôtel-Dieu de Montréal
ATCC 46229	LSPQ

2.1.2. Antibiotiques et produits chimiques

Les antibiotiques et les produits chimiques ont été fournis par les compagnies suivantes :

American chemicals Ltd, Mtl., Québec

- le phosphate de sodium monobasique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- l'acide acétique glacial (CH_3COOH)
- le chlorure de sodium
- le phénol

Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca.

- Coffret de coloration au nitrate d'argent
- le colorant concentré pour le dosage des protéines
- le N,N'-méthylène bisacrylamide (BIS)
- l'acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$)
- la protéine étalon

Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ

- le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4)
- le phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4)
- le saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
- l'hydroxyde de sodium (NaOH)
- le chlorure d'hydrogène (HCl)

J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ

- le phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4)

LKB Produkter, AB, Bromma, Sweden

- le bleu de bromophénol

Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo.

- la glycine ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)
- le 2-mercaptoéthanol
- le TEMED ($\text{N,N,N,N}'$ -tétraméthyléthylènediamine)
- le persulfate d'ammonium (APS)
- le lysozyme (N-acetyl muramoyl hydrolase E.C.3.2.1.17)
- la ribonucléase A (RNase)
- la déoxyribonucléase 1 (DNase)
- le PMSF (phényl méthyl-sufonyl fluoride)
- le Tris-HCl (trizma hydrochloride)
- l'isopropanol
- l'EDTA (éthylènediamine-acide tétraacétique)
- le sarkosyl
- le SDS (sodium dodécyl sulfate)
- la pénicilline
- la tétracycline
- la ciprofloxacine
- l'acétate de potassium
- le chloroforme
- l'alcool-iso-amylque

- xylène cyanole F F
- le trizma base : tris (hydroxyméthyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)
- phényl méthyl sulfonyl fluoride
- DTT (DI-Dithiothreitol) ($C_4H_{10}O_2S_2$)

Life Technologies

- Supercoiled DNA ladder
- Tampon phosphate saline

Upjohn Company of Canada, Don Mills Ontario

- la spectinomycine

Hoffmann-la Roche limited, Mississauga, Ontario

- la ceftriaxone

Lederle Laboratories DIV Pearl River, N,Y

- la cefixime

2.1.3. Milieux de culture

Le bouillon trypticase et soya, le bouillon de Mueller-Hinton, BBL Microbiology systems, Md. (Div. Becton Dickinson and Co.)

l'agar G.C, BBL Microbiology Systems, Md. (Div. Becton Dickinson and Co.)

l'isovitalex 1%, BBL Microbiology Systems, Md. (Div. Becton Dickinson and Co.)

les géloses au chocolat et Thayer Martin (les laboratoires QUELAB, Montréal)

2.1.4. Appareils utilisés

- le turbidomètre, Abbott Laboratories, Irving, TX.
- le replicateur (Steers Replicating Device), Craft Machine Inc., Chester, Pa.
- le pHmètre, Corning Scientific Instruments, Modèle 10
- l'autoclave AMSCO Laboratories, Canada
- la balance de précision, Sartorius, Werke GMBH 2400
- le spectrophomètre Spectronic 20
- la camera polaroid, MP4 Fisher Scientific
- la centrifugeuse RC2-b (rotor : SS34) Sorvall
- l'ultracentrifugeuse TL-100 (rotor : TLS-55) Beckman, Palo Alto, Ca.
- l'ultracentrifugeuse TL-70 , Beckman, Palo Alto, Ca.
- le sonicateur MSE soniprep 150

2.2. Méthodes

2.2.1. Caractérisation des souches de *N. gonorrhoeae* étudiées

2.2.1.1. Identification des souches

Les souches de *N. gonorrhoeae* du Canada, ont été isolées au laboratoire de microbiologie du CHUM à partir des prélèvements urétraux, cervico-vaginaux et anaux. Les spécimens sont inoculés sur gélose au chocolat incubée pendant 18 à 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les souches sont identifiées par les caractéristiques

morphologiques des colonies observées sur gélose au chocolat, la coloration au Gram négatif, le test d'oxydase et l'utilisation des carbohydrates. Les souches ont été suspendues dans le milieu de trypticase soy contenant 10% de glycérol et gardées en aliquots à -70°C jusqu'à utilisation. Quant aux isolats du Cameroun, ils ont été isolés des prélèvements génitaux au laboratoire de microbiologie du Centre Pasteur de Yaoundé, Cameroun.

Les écoulements urétraux ont été prélevés à l'anse de platine et ensemencés sur gélose au chocolat additionnée de complément polyvitaminique. Les prélèvements cervico-vaginaux ont été mis en culture sur gélose au chocolat enrichie en supplément G et additionnée de mélange inhibiteur VCF. Ces milieux inoculés sont incubés 24 à 48 heures à 37°C en présence de 5% à 10% de CO_2 .

L'identification des gonocoques a été faite selon les mêmes critères cités auparavant. Ces souches ont été resuspendues dans un milieu de conservation et de transport fourni par le LSPQ, Canada.

2.2.1.2. Détection de β -lactamase

La détection des β -lactamases a été réalisée par la technique de céphalosporine chromogène, la nitrocefine (Difco laboratories, Detroit M L.)

2.2.1.3. Serotypage *N.gonorrhoeae*

Le séro groupe des souches de *N. gonorrhoeae* a été déterminé par la technique de co-agglutination.

Une suspension bactérienne d'une turbidité équivalente à 0,5 MacFarland a été préparée en solution saline (0,9% NaCl) à partir des cultures sur milieu solide. Après avoir été portées à ébullition pendant 5 min, les suspensions bactériennes ont été refroidies à la température ambiante.

Une goutte de chacun des réactifs WI et WII/ WIII du test Phadebact Monoclonal GC a été déposée sur une lamelle et mélangée avec une goutte de la suspension bactérienne, puis le mélange est agité délicatement. Une minute plus tard une réaction d'agglutination a été observée à l'œil nu si la suspension reagit avec les WI ou WII/WIII selon le type de protéine (PIA ou PIB, respectivement) présent dans la membrane externe du gonocoque.

2.2.1.4. Test de sensibilité bactérienne aux antibiotiques

Les antibiotiques suivants ont été utilisés dans cette étude : pénicilline G (PEN), tétracycline (TET), ciprofloxacine (CIP) (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo). spectinomycine (SPC) (Compagnie Upjohn du Canada), céfixime (CFX) (Lederle Laboratories Div), ceftriaxone (CEF) (Hoffman-La Roche limited).

Les solutions mères d'antibiotiques sont préparées à des concentrations d'au moins 1000ug/ml. Des dilutions sériées d'antibiotiques ont été faites de 0,03 à 32 ug/ml pour la pénicilline et la tétracycline; de 0,0005 à 0,5 ug/ml pour la céfixime et le ceftriaxone de 0,001 à 16 ug/ml pour la ciprofloxacine; et de 2 à 128 ug/ml pour la spectinomycine. Puis ces dilutions d'antibiotiques ont été incorporées aux géloses G.C. contenant 1% d'isovitalex. Ces géloses ont été ensuite conservées à 4°C pour une période n'excédant pas 24 heures.

A l'aide d'un écouvillon stérile, nous avons prélevé les colonies cultivées sur gelose au chocolat, incubées à 37°C pendant 18 heures en présence de 5% de CO₂, des souches à l'étude ainsi que la souche de référence (*Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226). Ces bactéries ont été inoculées dans le bouillon de Mueller Hinton (MH) pour obtenir une suspension bactérienne de turbidité équivalente à 0.5 MacFarland, soit environ 5x10⁸ unités viables par ml. 1ml d'inoculum de ces différentes souches a été déposé à la surface des géloses G.C., contenant les différentes dilutions d'antibiotiques, à l'aide d'un inoculateur à tête multiple (Melrose Machine Shop, Delco, PA). Une gélose témoin ne contenant pas d'antibiotique a été ensemencée afin de s'assurer de la viabilité des bactéries et de l'absence de contamination, et une gélose au chocolat a été ensemencée pour vérifier cette fois le nombre d'unités viables de l'inoculum (100 bactéries). Les géloses G.C. ainsi ensemencées ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂. La concentration minimale inhibitrice (CMI) définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne visible à l'œil nu est déterminée

après 20 heures d'incubation. Les résultats des CMI de tous les antibiotiques ont été interprétés suivant les valeurs rapportées pour *N. gonorrhoeae* par le NCCLS (1997).

2.2.1.5. Extraction des plasmides

Les plasmides d'ADN ont été isolés par lyse alcaline selon la méthode de Birnboim et Doly (1979) avec quelques modifications. Les gonocoques sont ensemencés sur gélose au chocolat à 37°C pendant 20 heures en présence de 5% de CO₂. Cinq à six grosses colonies sont recueillies et suspendues dans le tampon phosphate saline 0,001 M pH 7,2. Ensuite ces bactéries ont été sédimentées par centrifugation et resuspendues dans 100 µl d'une solution contenant Tris Hcl 25 mM pH 8, glucose 50 mM, et EDTA 10 mM pH 8. Après incubation pendant 5 min à température de la pièce, les cellules sont lysées par l'addition de 200 µl d'une solution composée de 1% SDS et 0,2N NaOH. Après une autre incubation de 5 min à la température ambiante, 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 5 M et d'acide glacial ont été ajoutés. Les tubes sont placés dans la glace pendant 5 min. Le matériel ainsi précipité est séparé par centrifugation. Le surnageant contenant des plasmides a été transféré dans un nouveau tube stérile. Un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamyl a été ajouté. Après agitation, la phase aqueuse est séparée par centrifugation à 14000 rpm pendant 2 min dans un microfuge eppendorf de modèle 5415 (Brinkmann Instruments, Rexdale, Ont), 450 µl de surnageant ont été transférés dans un autre tube. L'ADN plasmidique a été précipité par l'addition de 2 volumes d'éthanol 100% à la température de la pièce pendant 2 min. Après une centrifugation de 5 min, l'éthanol a été éliminé et le culot a été lavé par l'éthanol 70%,

suite à une centrifugation pendant 2 min. Le culot d'ADN a été séché, puis resuspendu dans 20 µl de TE (10 mM Tris HCL pH 8 et 10 mM EDTA 0,5 M), celui-ci sera ensuite analysé sur gel d'agarose.

2.2.1.5.1. Électrophorèse de plasmides sur gel d'agarose

Seize microlitres de l'ADN plasmidique, ont été préparés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose 0,9% selon la méthode décrite par Maniatis et coll.,(1982). L'ADN plasmidique a été dilué dans un tampon composé de 0,25 M de bleu de bromophénol et 30% de glycérol. La migration s'est effectuée dans le tampon TAE contenant le bromure d'ethidium (1 mg/ml), à un voltage constant de 70 V pendant 9 heures et 120 A. Les plasmides ont été visualisés à l'aide d'un transilluminateur UV (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ) et photographiés à l'aide d'un appareil Polaroid DS-34 sur pellicule Polaroid-667 (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ).

2.2.1.5.2. Estimation du poids moléculaire des plasmides

Le poids moléculaire des plasmides a été estimé par comparaison de leurs caractéristiques migratoires avec celles de fragments de poids moléculaires connus des marqueurs "supercoiled DNA Ladder" (Life Technologies).

2.2.1.6. Profils électrophorétiques des protéines par SDS-PAGE

L'analyse des protéines de la membrane externe est effectuée suite à leur isolation par la solubilisation de la membrane interne et du peptidoglycan en présence du sarkosyl. Les protéines de la membrane sont contenues dans la fraction insoluble. La méthode utilisée a été décrite par Spratt, (1977) et Ravaoarino et coll., (1994) avec quelques modifications pour les exigences de la bactérie.

2.2.1.6.1. Croissance bactérienne et préparation à l'extraction de la membrane externe

Sept géloses au chocolat par souche ont été ensemencées, et incubées pendant 18 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les colonies bactériennes ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile et suspendues dans du tampon phosphate salin 0,01 M, pH 7,2. La densité optique (Coleman Jr, II, spectrophotometer) de cette suspension a été ajustée à 2,985 à la longueur d'onde $\lambda \geq 590$ nm. Cette suspension a été centrifugée à 9000 rpm (9800 ×g) (Sorvall, RC2-B, rotor SS34), pendant 20 minutes à 4°C. Les culots cellulaires obtenus sont lavés deux fois par centrifugation à 9000 rpm (9800 ×g), pendant 10 minutes à 4°C, dans du tampon phosphate (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0) et repris dans 20 ml du même tampon.

2.2.1.6.2. Extraction de la membrane externe

La membrane externe a été extraite par traitement des cellules aux ultrasons (MSE soniprep 150) à une amplitude de 18 μ pour 5 minutes: une minute de traitement aux ultrasons, suivie d'une minute de repos. La pause évite la formation de mousse causant la dénaturation des protéines et permet de contrôler la température. Lors du traitement, l'échantillon est conservé dans un bain de glace. Les débris cellulaires ont été séparés par centrifugation à 9000 rpm (9800 G, Sorvall, RC2-B, rotor SS34) pendant 10 minutes à 4°C. Les membranes totales ont été récoltées par centrifugation à 52000 rpm à 4°C pendant 45 minutes puis, lavées deux fois dans le tampon phosphate (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0). Les culots sont repris dans 2 ml de tampon 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, puis répartis en aliquots de 500 μ l et conservés à -70°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.1.6.3. Isolation des protéines de la membrane externe

La séparation de la membrane externe se fait avec 500 μ l de membrane (5 à 10 mg/ml), en présence de 250 μ l de sarkosyl à 20% et 300 μ l d'eau distillée suivi d'une incubation à température ambiante pendant 20 minutes. Le sarkosyl dénature les PLP et solubilise les protéines de la membrane interne et le peptidoglycane. La fraction insoluble dans le sarkosyl, contient la membrane externe. Les membranes externes sont récupérées par ultracentrifugation à 52000 rpm à 4°C pendant 45 minutes. Les protéines de la membrane externe sont ensuite reprises dans 2000 μ l de sarkosyl à 1% et incubées

pendant 10 minutes à la température de la pièce. Elles sont ultracentrifugées à 52000 rpm à 4°C pendant 45 minutes. Les culots obtenus sont lavés deux fois par centrifugation à 52000 rpm à 4°C pendant 45 minutes, avec 2000 µl de tampon 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 et sont resuspendues dans 150 µl du même tampon, puis séparées en aliquots de 50 µl et congelés à -70°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.1.6.4. Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide

La méthode implique la séparation des polypeptides suivant la longueur et la charge de la chaîne. Le SDS détruit la structure secondaire et la structure tertiaire, et le 2-mercaptoéthanol est utilisé pour rompre les ponts disulfure interne et externe. Ceci permet aux polypeptides de migrer à travers le gel de polyacrylamide. Seuls les gels de concentration sont utilisés en employant le système de tampon discontinu de Laemmli (1970). La préparation des solutions de travail est décrite dans les annexes.

Les protéines ont été séparées par migration sur gel de polyacrylamide à 12,5%, en présence de SDS (Laemmli et Favre, 1970). Un volume de 50 µl de protéines a été solubilisé dans le tampon d'échantillon qui contenait: 0,8 g de SDS, 4 ml de 0,5 M Tris pH 6,8, 2,5 ml de glycérol, 1 ml de 2-mercaptoéthanol et 0,05% de bleu de bromophénol. Les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 min. La migration a été faite en appliquant un voltage constant de 200 V à une chambre d'électrophorèse contenant le tampon de migration composé de 28,8 g de glycine, 6 g de Tris-Base, et 1g de SDS dissout dans 1 l d'eau distillée (pH 8,4).

2.2.1.6.5. Coloration des gels

Les bandes de protéines présentes sur le gel sont révélées au nitrate d'argent. Nous avons utilisé un coffret de réactifs de Bio-Rad. Après la migration, les protéines sont fixées toute la nuit dans une solution de 40% de méthanol et 10% d'acide acétique. Une oxydation de 5 minutes s'en est suivie. Par la suite le gel est lavé à l'eau distillée pendant 15 minutes. Les protéines ont été colorées dans une solution de nitrate d'argent pendant 20 minutes et révélées par une solution de développement pendant 15 minutes environ jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée. La réaction est arrêtée par la solution de 5% d'acide acétique. Les gels ont été photographiés à l'aide d'une caméra Polaroid (Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ).

2.1.6.6 Détermination de leur poids moléculaire

Les poids moléculaires des protéines sont déterminés par comparaison de leur mobilité électrophorétique avec celles des protéines de poids moléculaires connus inclus dans chaque gel. Ces protéines sont la phosphorylase b (97,4 kDa), l'albumine bovine (66,2 kDa), l'ovalbumine (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine du soya (21,6 kDa) et le lysozyme (14,4kDa) (Bio-Rad laboratories, Richmond, Ca).

3. Résultats

3.1 β -lactamase

Nous avons effectué respectivement le test de céphalosporine chromogène sur les deux groupes d'isolats : le premier étant les souches du Canada (groupe A) et le second les souches du Cameroun (groupe B). 9 souches sur 50 du Canada sont trouvées PPNG soit 18%. Par contre, 17 souches sur 30 du Cameroun soit 56,7% le sont.

3.2. Sérotypage

L'identification sérologique des souches de deux groupes s'est faite par la méthode de coagglutination. Cette étude montre que 92% (46/50) des souches du premier groupe sont du sérotype WII/III, contre 63,4% (19/30) de celles du second groupe. Quant au sérotype WI, il est observé dans 6% de celles du Canada et 33,4% de celles du Cameroun, une souche non typable de part et d'autre a été aussi trouvée.

3.3. La sensibilité aux agents antimicrobiens

La méthode de dilution en gelose décrite par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), a été utilisée pour déterminer les CMI (concentrations minimales inhibitrices) des six antibiotiques pour les deux groupes de souches.

Les CMI₉₀ ont été déterminées selon les seuils de sensibilité établis par NCCLS, 1997. Dans le groupe A 24% (12/50) des souches sont résistantes à la pénicilline, avec la CMI₉₀ à 8 µg/ml. Parmi les souches résistantes, trois ne produisent pas de pénicillinase, mais ont les CMI₉₀ à 2 µg/ml. 72% (36/50) de souches sont modérément sensibles à la pénicilline avec des CMI₉₀ variant entre 0,125 et 1 µg/ml. Les 2 autres (4%) sont sensibles à cette drogue. Les CMI₉₀ pour la tétracycline montrent que 62% (31/50) sont résistantes à la tétracycline (CMI₉₀ à 2 µg/ml), tandis que 36% (18/50) sont considérées modérément sensibles. Une seule souche est sensible à cet antibiotique. Une résistance chromosomique à la pénicilline (CMI₉₀ 2 à 4 µg/ml) a été observée dans 10% d'isolats et à la tétracycline (CMI₉₀ 2-8 µg/ml) dans 29 d'isolats. La résistance plasmidique à ces deux antibiotiques est trouvée dans 8 et 2 souches respectivement. Toutes les souches PPNG, non PPNG et TRNG du groupe A sont sensibles aux autres antibiotiques incluant : la ceftriaxone, la cefixime, la spectinomycine, et la ciprofloxacine. (tableau 2).

Par contre, les souches du groupe B ont un taux de résistance beaucoup plus élevé aux antibiotiques couramment utilisés. Leur sensibilité aux agents antimicrobiens a donné les résultats suivants : 56,6% (17/30) de souches résistantes à la pénicilline avec la CMI₉₀ à 32 µg/ml. Les 13 autres souches sont modérément sensibles à la pénicilline. Quant à la sensibilité à la tétracycline, la résistance a été observée dans 86,6% (26/30), avec la CMI₉₀ à 32µg/ml. Le reste d'isolats est modérément sensible à cette drogue. Parmi les souches résistantes à la tétracycline 22 présentent une résistance très élevée à la tétracycline (CMI \geq 32 µg/ml), et 11 souches sur les 22 sont aussi productrices de β -

lactamase. En outre la résistance à médiation chromosomique à la tétracycline est observée dans une souche; et dans trois souches résistantes à la pénicilline.

Tout comme les souches du groupe A, celles du groupe B sont toutes sensibles à la ceftriaxone, à la cefixime, à la spectinomycine, et à la ciprofloxacine, à l'exception de la souche 17GA du Cameroun qui présente une sensibilité décroissante à la ceftriaxone et à la cefixime (CMI $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$). Cette valeur n'a pas été interprétée à cause de manque de critère d'interprétation. (tableau 3).

Tableau 2 : CMI's de six antimicrobiens et incidence de resistance de *N. gonorrhoeae* isolé au Cameroun.

Agents antimicrobiens	Intervalles μg/ml	CMI ₅₀ μg/ml	CMI ₉₀ μg/ml	% de résistance
Pénicilline	0,125 - ≥ 32	1	32	56,7
Tétracycline	0,5 - ≥ 32	16	32	86,6
Spectinomycine	4 - 16	8	16	0
Ceftriaxone	0,001 - ≥ 0,5	0,002	0,016	0
Ciprofloxacine	0,0005 - 0,008	0,004	0,008	0
Cefixime	0,001 - 0,5	0,004	0,016	0

Seuils de sensibilité des antibiotiques :

PEN : ≥ 2 (R); TET : ≥ 2 (R); SPE : ≥ 128 (R); CEF : ≤ 025 (S) ; CFX : ≤ 025 (S) ;

CIP : ≥ 1.

Tableau 3 : CMI₅₀ de six antimicrobiens et incidence de résistance de *N. gonorrhoeae* isolées du Canada.

Agents antimicrobiens	Intervalles µg/ml	CMI ₅₀ µg/ml	CMI ₉₀ µg/ml	% de résistance
Pénicilline	≤ 0,03 - ≥ 32	0,5	8	16
Tétracycline	0,25 – 2	1	2	62
Spectinomycine	8 - 32	16	32	0
Ceftriaxone	0,001 – 0,5	0,008	0,125	0
Ciprofloxacine	0,0005 – 0,5	0,004	0,008	0
Cefixime	0,001 – 0,064	0,008	0,032	0

Seuils de sensibilité des antibiotiques :

PEN : ≥ 2 (R); TET : ≥ 2 (R); SPE : ≥ 128 (R); CEF : ≤ 025 (S) ; CFX : ≤ 025 (S) ;

CIP : ≥ 1.

3.4. Profils plasmidiques

L'ADN plasmidique des souches de *N. gonorrhoeae* provenant du Canada (A) et du Cameroun (B) a été extrait par la méthode de lyse alcaline et analysé sur gel d'agarose (figure 1 et 2).

Dans le groupe A : 1/13 de ces souches possèdent le plasmide 7,04 Kb (type asiatique) et 9/13 ont un plasmide 8,06 Kb. 11/13 présentent une bande plasmidique approximativement à 3,9 Kb. 6/13 souches possèdent de bandes de poids moléculaire élevé > 16,2 Kb. Une souche possède un plasmide de 10,10 Kb.

Quant au groupe B, les profils plasmidiques obtenus nous donnent les résultats suivants :

Toutes les souches ont le plasmide 8,06 Kb . Quatre de ces souches ont le plasmide 7,04 MDa (type asiatique) et les mêmes souches se sont trouvées hébergeant le plasmide avec un poids moléculaire élevé > 16,21 Kb. 10/11 souches ont le plasmide à 14,17 Kb et 9/12 ont une bande > 16,21 Kb. 100% des souches du Cameroun présentent une bande à 3,99 Kb.

3.5. Profils électrophorétiques des protéines de la membrane externe

L'extraction des protéines de la membrane externe du *N.gonorrhoeae* avait pour but de montrer que celui-ci pourrait être typé par cette méthode, et de voir si par les

protéines nous pourrions établir une corrélation avec les profils de résistance. Ceux-ci ont été établis et deux souches représentatives de chaque profil sont analysées par le profil électrophorétique de leur membrane externe. L'analyse des protéines de la membrane externe sur gel de polyacrylamide à 12,5% a été effectuée après leur extraction par solubilisation de la membrane interne et du peptidoglycane en présence du sarkosyl. Cette analyse a montré des bandes à 38 kDa et qui est présente chez toutes les souches étudiées. Par contre, il y a une expression variable des bandes à 21,5 kDa (PII varie de 21 kDa à 32 kDa), parmi les souches (figure 3 et 4). En même temps des bandes de poids moléculaire très élevé 66 kDa et 45 kDa ont été observées dans certains isolats (5HD, 7HD, 15YA, 21YA).

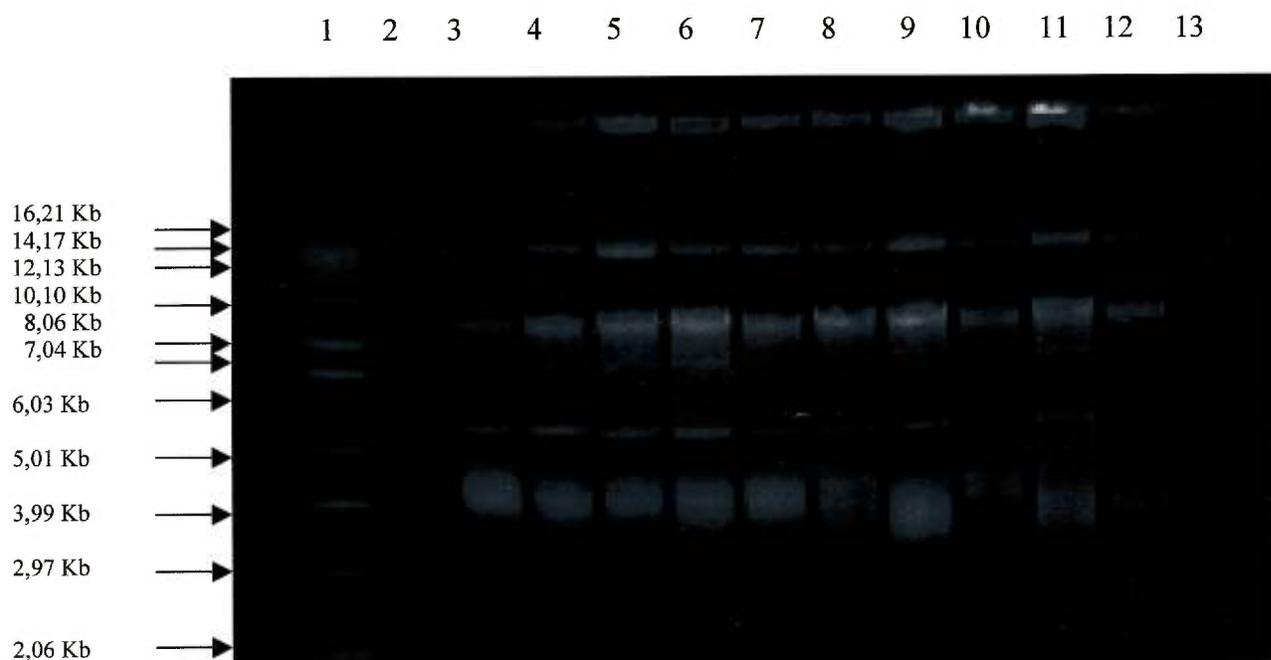


Figure 1 : Profils plasmidiques de 11 souches de *N gonorrhoeae* isolées au Cameroun.

Colonne 2 : témoin négatif Xm5 (souche de *Xanthomonas*); 3: 16GA : souche intermédiaire à la PEN et à la TET; 12 : 22GA: souche résistante à la PEN et intermédiaire à la TET; 4 : 8GA, 5 : 19GA, 6 : 12GA, 11 : 28GA: souches résistantes à la PEN et à la TET; 7 : 7GA, 8 : 9GA, 9 : 18GA, et 10 : 26GA : souches intermédiaires à la PEN et résistantes à la TET. 13 : ATCC 49226; colonne : 1 "supercoiled DNA ladder": (Life Technologies :2,067; 2,972; 3,990; 5,012; 6,030; 7,045; 8,066; 10,102; 12,138; 14,174; 16,210/Kb).

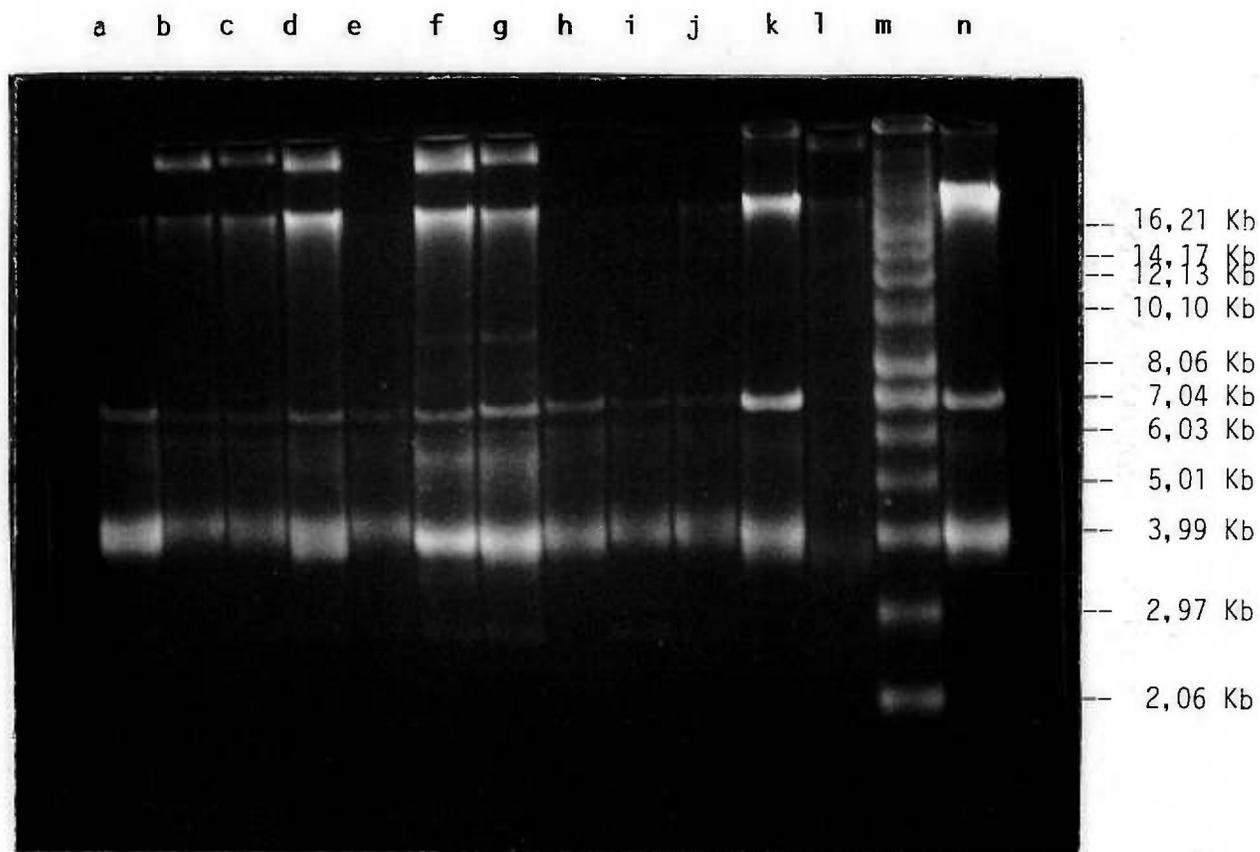


Figure 6 : Profils plasmidiques de 13 souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada et au Cameroun. **f** : 19HD; **g** : 17GA; **l** : 37HD et **n** : 14GA : souches résistantes à la PEN et à la TET; **a** : 3YA, **d** : 15GA, **h** : 16GA : souches résistantes à la PEN et intermédiaires à la TET; **b** : 25GA, **c** : 3HD, et **j** : 46HD : souches intermédiaires à la PEN et résistantes à la TET; **e** : 1YA, **i** : 7HD et **k** : 2HD : souches intermédiaires à la PEN et à la TET. colonne **m** : "supercoiled DNA ladder": (Life Technologies :2,067, 2,972, 3,990, 5,012, 6,030, 7,045, 8,066, 10,102, 12,138,14,174,16,210/Kb).

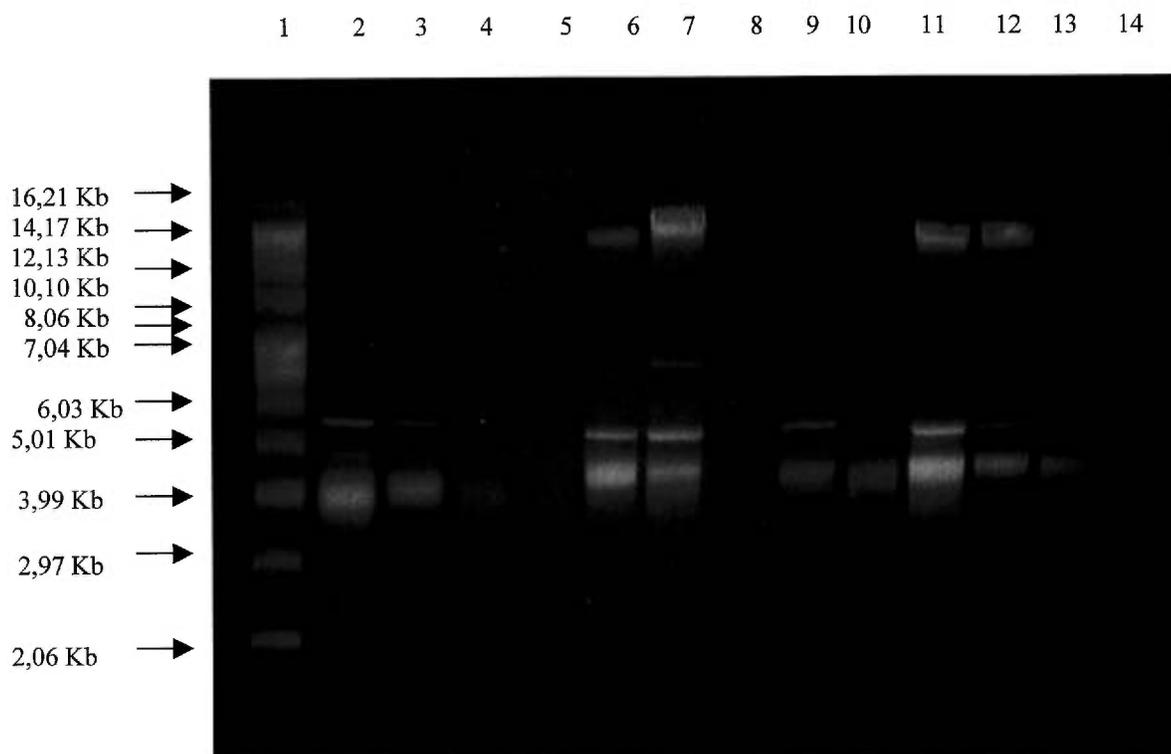


Figure 2 : Profils plasmidiques de 11 souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada.

Colonne **14** : témoin négatif Xm5 (souche de *Xanthomonas*); **4** : 4HD et **5** : 9HD ; souches intermédiaires à la PEN et à la TET; **6** : 18HD, **7** : 16HD, **11** : 8HD, **12** : 5HD : souches résistantes à la PEN et à la TET; **2** : 21HD; **3** : 27HD : souches intermédiaires à la PEN et résistantes à la TET. **9** : 3HD, **10** : 10HD; **13** : 6HD : souches résistantes à la PEN et intermédiaires à la TET, **8** : ATCC 49226; colonne : **1** "supercoiled DNA ladder": (Life Technologies :2,067; 2,972; 3,990; 5,012; 6,030; 7,045; 8,066; 10,102; 12,138; 14,174; 16,210/Kb).

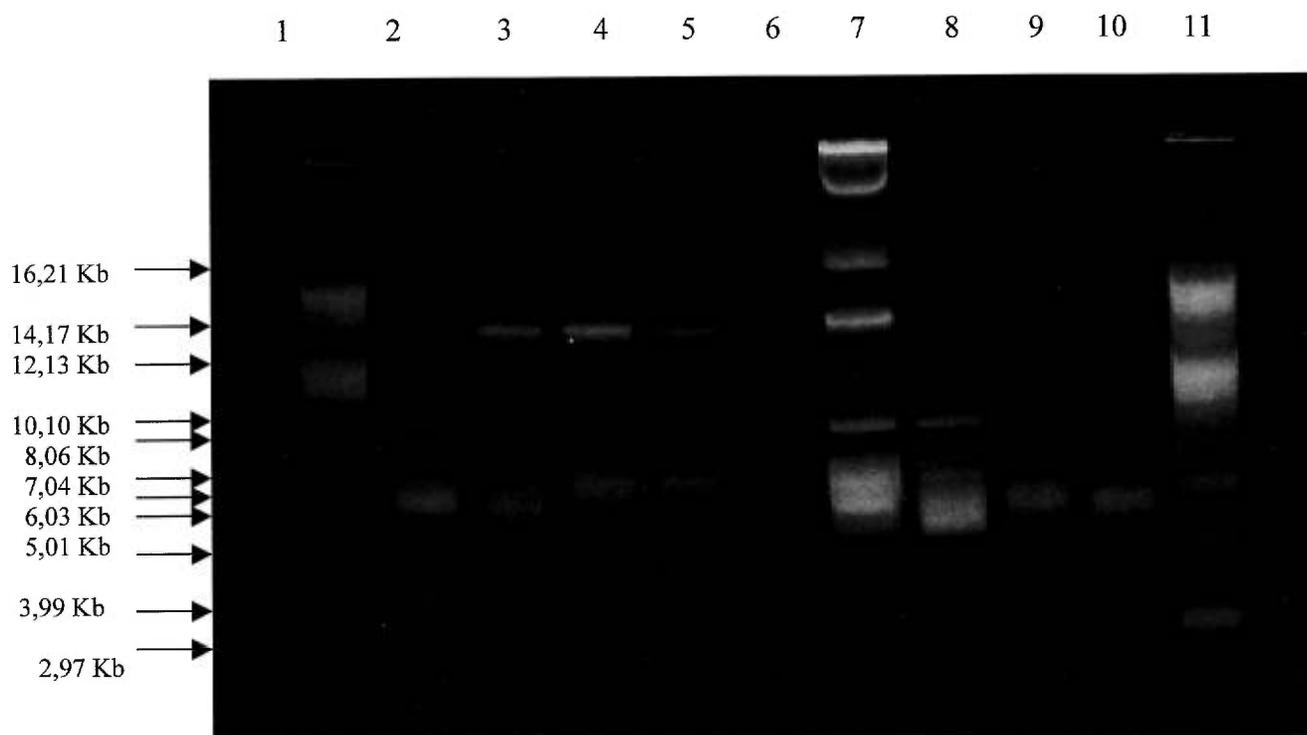


Figure 5 : Profils plasmidiques de 11 souches de *N gonorrhoeae* isolées au Canada et au Cameroun. **3** : 14GA, **4** : 23GA, **5** : 11GA, **7** : 19HD, et **8** : 30HD : souches résistantes à la PEN et à la TET; **2** : 2YA, **9** : 46HD, : souches intermédiaires à la PEN et résistantes à la TET; **6** : 35HD: souche sensible à la TET et à la PEN; **10**: ATCC 49226; colonnes **1** et **2** : "supercoiled DNA ladder": (Life Technologies : 2,067; 2,972; 3,990; 5,012; 6,030; 7,045; 8,066; 10,102; 12,138; 14,174; 16,210/Kb).

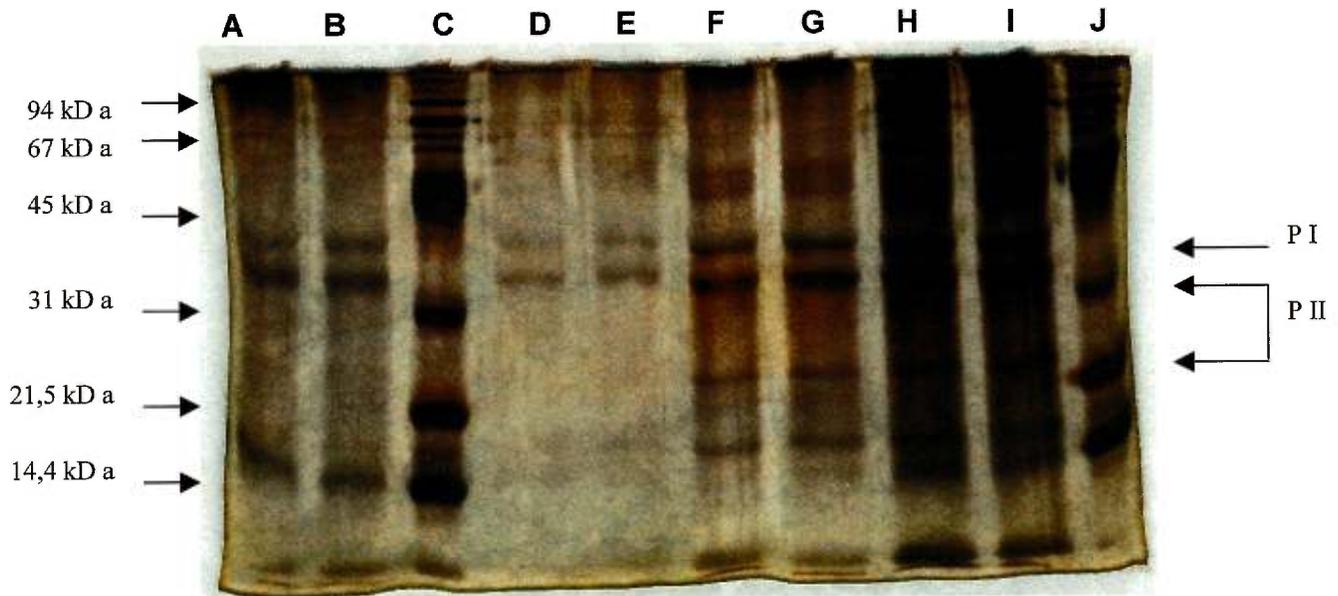


Figure 3 : Profils électrophorétiques des PME de *N. gonorrhoeae* isolés au Cameroun sur SDS-PAGE. Les échantillons des colonnes représentent respectivement : **A : 3YA** et **B : 7YA** : souches résistantes à la TET et intermédiaires à la PEN; **D : 1YA** : souche intermédiaire à la TET et à la PEN; **E : ATCC 49226**; **F : 16GA** et **G : 21GA** : souches résistantes à la PEN et intermédiaire à la TET; **H : 5YA** et **I : 15GA** : souches résistantes à la PEN et à la TET . Tous ces isolats ont été traités avec du sarkosyl à 20% et du 2-mercaptoéthanol à 5%. Les colonnes **C** et **J** représentent la protéine-étalon : 97,4 kDa (phosphorylase b), 66,2 kDa (albumine sérique), 45 kDa (Ovalbumine), 31 kDa (anhydrase carbonique), 21,5 kDa (Inhibiteur de trypsine) 14,4 kDa (Lysozyme).

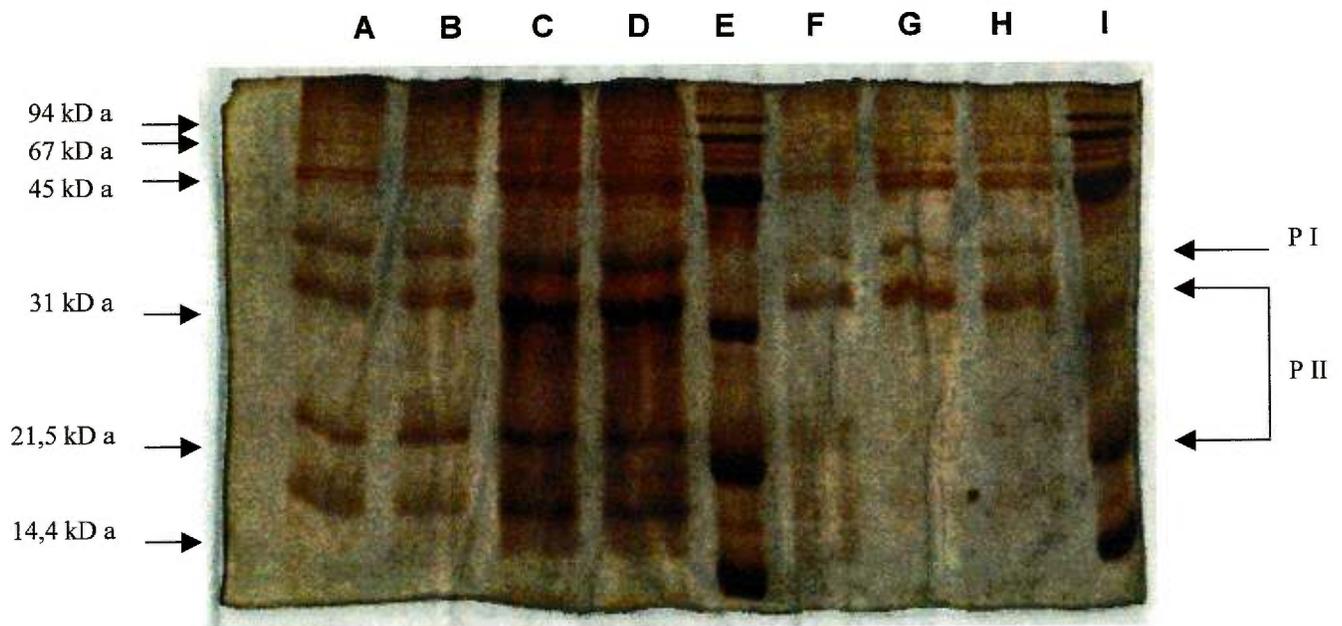


Figure 4 : Profils électrophorétiques des PME de *N. gonorrhoeae* isolé au Canada sur SDS-PAGE. Les échantillons des colonnes représentent respectivement : **A** : 10HD et **B** : 22HD : souches résistantes à la PEN et intermédiaires à la TET; **C**: 37HD et **D**: 5HD : souches résistantes à la TET et à la PEN; **F**: ATCC 49226; **G** : 28HD : souche sensible à la TET et à PEN, et **H** : 29HD : souche résistante à la PEN et intermédiaire à la TET. Tous ces isolats ont été traités avec du sarkosyl 20% et du 2-mercaptoéthanol 5%. Les colonne **E** et **I** représentent la protéine-étalon : 97,4 kDa (phosphorylase b); 66,2 kDa (albumine sérique); 45 kDa (Ovalbumine); 31 kDa (anhydrase carbonique); 21,5 kDa (Inhibiteur de trypsine); 14,4 kDa (Lysozyme).

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons essayé de caractériser les souches de *N. gonorrhoeae* isolées dans deux pays différents : à savoir le Cameroun (groupe B) et le Canada (groupe A). Ces caractéristiques pourraient permettre d'établir ainsi des comparaisons des souches de ces deux aires géographiques différentes. Il faut préciser que les souches camerounaises et canadiennes productrices et non productrices de β -lactamase ont été sélectionnées à partir de la collection d'isolats cliniques de *N. gonorrhoeae* disponibles respectivement au laboratoire du CHUM et au Centre Pasteur de Yaoundé. Ainsi, les pourcentages de résistance aux antibiotiques donnés ne représentent pas la prévalence des souches résistantes de *N. gonorrhoeae* dans ces deux pays.

La sensibilité des isolats du groupe A à six agents antimicrobiens étudiés a montré que la résistance extrinsèque (à médiation plasmidique, CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) est le principal mécanisme de résistance de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, tandis que cinq souches présentaient une résistance intrinsèque (à médiation chromosomique, CMI de 2 à 4 $\mu\text{g/ml}$). Ces données correspondent à celles rapportées dans plusieurs études au Canada et dans divers autres pays. Ces études montrent que la résistance à médiation plasmidique est plus fréquente que celle de type chromosomique (Anonymes, 1990a; Clendennen et coll., 1992). La résistance à la tétracycline a été

observée dans 31 souches canadiennes, dont 27 ont pour valeurs de CMI égales à 2 µg/ml ce qui constitue une résistance de faible niveau.

Cependant, notons que cette résistance aussi basse soit-elle, le nombre d'isolat est tout de même important. Ceci pourrait nous amener à croire que la sensibilité à la tétracycline des isolats canadiens décroît progressivement.

Des rapports ont souvent donné la CMI₉₀ à 1 µg/ml pour cette drogue, mais nous l'avons à 2 µg/ml. En outre, 18 souches ont été classées comme modérément sensibles à cet antibiotique selon les seuils de sensibilité du NCCLS. Ces résultats intermédiaires sont dus en plus grande partie à plusieurs facteurs techniques. Le NCCLS (1990) a rapporté que chez les patients ayant ces souches le taux de guérison se situe entre 85 et 95%, ce qui est inférieur à celui de plus de 95% observé avec les souches sensibles. Malgré toutes ces constatations, la tétracycline seule n'est pas recommandée pour le traitement de la gonorrhée au Canada (Anonymes, 1990a). La situation est différente au Cameroun où l'on prescrit cet antibiotique selon les signes cliniques.

La sensibilité de toutes les souches vis-à-vis de la ceftriaxone confirme que cet antibiotique reste parmi les antibiotiques les plus actifs, et donc les plus efficaces contre les gonocoques. Par ailleurs, nos isolats canadiens ont montré un taux de sensibilité de 100% pour les autres antibiotiques : (cefixime, spectinomycine, ciprofloxacine).

Malgré qu'à l'heure actuelle les rapports indiquent une sensibilité décroissante à la ciprofloxacine. Cette dernière n'est recommandée pour la gonorrhée au Canada pour

les souches de provenance asiatique (Philippines) (Anonymes, 1996). En général, on peut constater que la multirésistance n'est pas présente chez les souches du groupe A. Cette observation n'est pas surprenante, si l'on considère que les isolats multirésistants représentent des cas isolés. Et, il existe au Canada un programme permanent de surveillance des isolats de *N. gonorrhoeae* au niveau national. Ce programme a pour objectif de contrôler des gonocoques antibiorésistants (Anonymes, 1990a).

L'analyse du contenu plasmidique des souches du groupe A a révélé la présence du plasmide 3,99 Kb dans presque toutes les souches, celui-ci serait le plasmide cryptique. Des données publiées antérieurement dans d'autres pays ont trouvé ce plasmide dans 100% des isolats traités. Des études canadiennes ont montré une prévalence semblable (Anonymes, 1990b). Cependant la fonction de ce plasmide reste jusqu'à présent inconnue.

Les plasmides de 7,045 Kb (type asiatique), connus pour coder la production de la β -lactamase TEM-1 (Brunton et coll., 1986), sont présents chez les souches du groupe A étudiées. Ces plasmides sont connus comme causant la résistance à la pénicilline, dont plusieurs rapports ont fait mention (Phillips, 1976). Plusieurs chercheurs avaient souligné l'association du plasmide conjugatif 37.7 Kb et du plasmide de 7,045 Kb (Palomares et coll., 1990). Nous n'avons pas mis en évidence le plasmide conjugatif de 37.7 Kb. Cependant nous avons observé des bandes de haut poids moléculaires >16,21 Kb (Jephcott et coll., 1986; Falk et coll., 1988; Anonymes, 1990a). Nous n'avons pas

observé le plasmide de 5,012 Kb (type africain). Par contre, un plasmide de 8,06 Kb a été observé. Un plasmide approximatif de 8,7 kD a été observé chez *H. ducreyi* et *N.gonorrhoeae*. Ce plasmide coderait pour la production de l'enzyme β -lactamase (McNicol coll., 1983). De même un plasmide de 10,10 kb a été observé dans cette étude. Celui-ci avait été trouvé en Nouvelle-Zelande, il coderait pour la production de l'enzyme β -lactamase. Dans leur rapport il s'agit d'un plasmide instable (Breatt, 1989).

Le sérotypage montre que le séro groupe WII/III est le plus prédominant parmi toutes les souches (92%). Il est présent chez 88,8% des souches productrices de β -lactamase, et chez 92,7% des isolats non producteurs de cet enzyme. Par conséquent, ce séro groupe est fréquent chez les souches sensibles. Nos résultats diffèrent de ceux publiés par d'autres chercheurs, qui ont observé une fréquence élevée du serogroupe WII/III chez les souches résistantes tandis que le séro groupe WI était associé plus fréquemment aux souches sensibles (Ison et coll., 1988; Palomares et coll., 1990). De même nos résultats démontrent la grande variabilité de caractéristiques existantes chez *N. gonorrhoeae*. Cependant la classification de nos souches en séro groupe seulement reste très limitée. Wooford et coll., (1989) ont constaté que dans le même serogroupe WII/III, il existe divers profils et degrés de sensibilité selon le sérovar. Il est donc possible que les souches β -lactamase positives et négatives, possédant le même séro groupe soient classées en sérovar, ce qui permettrait d'établir des différences de ces même souches. La classification des séro groupes en sérovary permettrait aussi une plus grande variété de classes, et possiblement d'établir une relation plus claire avec la sensibilité aux antibiotiques. Dans cette étude nous avons obtenu une souche non typable isolée au

Canada. Le rapport annuel, 1996 du LSPQ signale l'existence des souches de *N. gonorrhoeae* ayant les mêmes caractéristiques que la nôtre . Elle est non productrice de β -lactamase et ne répondant pas à l'épreuve de co-agglutination par la trousse de Phadebact. Deux souches représentatives de chaque profil sont analysées par leur profil électrophorétique des membranes externes. L'expression des protéines de la membrane externe sur gel de polyacrylamide chez toutes les souches étudiées montre l'absence de la protéine d'opacité (21,5 kDa) dans certaines souches parmi les souches résistantes à médiation plasmidique et les souches sensibles. Cette protéine (de 21,5 kDa à 31 kDa) est responsable de l'apparence des colonies et de l'adhésion aux cellules épithéliales et neutrophiles (Blake, 1985). Par contre les protéines I (38 kDa), ont été observées chez toutes les souches, incluant les souches présentant une CMI de pénicilline de 2 μ g/ml. Au vu de ce résultat, nous n'allons pas exclure la possibilité qu'il ait eu une altération au niveau de la porine chez ces souches. Il a été trouvé des modifications de cette protéine chez les souches montrant une résistance chromosomique (Guymon et coll., 1978; Furuki et Sparling, 1986).

Les caractéristiques des souches du groupe A analysées dans cette étude, nous permettent de constater que la résistance à la pénicilline par médiation plasmidique est le principal mécanisme utilisé. Celle-ci est due à la présence de plasmides de type africain et asiatique. La classe de séro groupe prédominant chez les souches sensibles et résistantes est WII/III.

Par contre, en ce qui concerne les souches du groupe B, nous avons clairement établi la présence de la multirésistance. Cependant un nombre limité de souches a été

obtenu du Cameroun, surtout à cause des difficultés de transport et la fragilité de ce microorganisme. Nos résultats indiquent la présence des PPNG dans ce pays : 56,7% (17/30). De même la sensibilité des souches camerounaises aux six antimicrobiens étudiés montrent aussi que la résistance extrinsèque est le principal mécanisme de résistance à la pénicilline, quant à la résistance intrinsèque elle s'observe dans trois souches. 86,7% (26/30) souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Cameroun sont résistantes à la tétracycline. Nos résultats confirment ceux rapportés par d'autres études, qui ont signalé l'émergence des souches de *N. gonorrhoeae* résistantes à la tétracycline (TRNG) en Afrique. Il est difficile de conclure si la propagation des TRNG est une conséquence de l'utilisation de la tétracycline. Cet antibiotique n'est pas utilisé comme traitement de la gonorrhée dans cette région. Le facteur le plus important contribuant à la propagation rapide des TRNG pourrait être l'utilisation incontrôlée et l'automédication avec la tétracycline pour une large gamme de maladies infectieuses. Cette résistance serait médiée par les plasmides parce que 26/30 souches du Cameroun ont montré une CMI ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$. Cependant nous n'avons pas isolé le gène responsable *tetM*, afin de pouvoir le confirmer avec certitude dans notre étude comme cela avait été fait dans d'autres études (Robert et coll., 1988). Elle survient aussi bien dans les souches non productrices de β -lactamase que les PPNG. Le diagnostic différentiel de la gonorrhée et du *Chlamydia* est rarement effectué au Cameroun. Et, la tétracycline est le plus souvent utilisée pour contrôler les infections lors d'un diagnostic présomptif simplement basé sur les signes et les symptômes cliniques. Ceci pourrait s'ajouter à ce qui a été dit plus haut pour expliquer la résistance du *N. gonorrhoeae* à la tétracycline que nous observons dans ce groupe d'isolats. Sur la base des données de sensibilité *in vitro* à la pénicilline et de la tétracycline, il apparaît que ces

deux antibiotiques ne peuvent pas être utilisés pour le traitement de la gonorrhée au Cameroun. Malgré le fait que nous ayons obtenu une souche avec une CMI $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ à la ceftriaxone et à la cefixime, celles-ci et bien d'autres peuvent être de bons candidats pour le traitement des infections à gonocoques causées par ces souches tel que recommandé par l'OMS.

Aucune résistance à la ceftriaxone n'a jamais été décelée en Afrique. Le prix élevé de cette drogue en Afrique contribue à limiter son utilisation. Cependant, après plusieurs années d'utilisation en Asie du Sud Est, aucun cas de résistance certaine n'a été rapporté jusqu'à présent.

Tous les isolats sont sensibles à la ceftriaxone, à la cefixime, à la spectinomycine, à la ciprofloxacine. La ciprofloxacine demeure efficace à 100% en Afrique. Cependant une sensibilité décroissante à la norfloxacine et l'ofloxacine qui font partie de la famille des quinolones a été décrite au Rwanda (Bogaerts et coll., 1993). L'émergence de la résistance à la ciprofloxacine en Asie du Sud Est nous amène à penser que cette résistance pourrait bientôt apparaître en Afrique, ce qui requiert une surveillance ferme. De notre étude, nous pourrions suggérer qu'il est probable que les souches de *N. gonorrhoeae* auraient été pleinement sensibles aux antibiotiques qui ne sont pas couramment utilisés au Cameroun. Comme c'est le cas de la spectinomycine et la ceftriaxone. Les résultats de la sensibilité à la ciprofloxacine de nos isolats nous amènent à dire que cet antibiotique représente une alternative viable pour le traitement de la gonorrhée au Cameroun.

L'étude sérologique des souches du groupe B montre que le serogroupe WII/III est prédominant parmi les souches soit 63,4% (19/30). 33,4% (10/30) appartiennent au serogroupe WI, et une souche s'avère non typable par cette méthode. WII/III est présente chez 64.7% des souches productrices de β -lactamase, et 43,4% chez les souches non productrices de cet enzyme. La présence de ce serogroupe aussi bien chez les souches résistantes et sensibles ne nous permet de l'associer à la résistance. Bien que d'autres rapports aient associé le serogroupe WII/III avec les niveaux élevés de résistance aux agents antimicrobiens.

Les profils plasmidiques des souches du Cameroun choisis selon leur sensibilité à la PEN et à la TET sont obtenus sur gel d'agarose. Parmi les souches examinées dans cette étude, 4/12 ont le plasmide à 7,045 Kb (type asiatique). Ces plasmides sont connus pour coder une β -lactamase *TEM1* (Brunton et coll., 1986). D'autres plasmides de 8,06 Kb et 10,10 Kb codant pour la production de l'enzyme β -lactamase (Breath, 1982 et Brunton et coll., 1982). Nous n'avons pas observé le plasmide 7,045 Kb qui serait probablement des souches importées.

L'incidence élevée des souches de *N. gonorrhoeae* portant le plasmide conjugatif 37,7 Kb a des implications importantes à l'épidémiologie de la gonorrhée. Ce plasmide est connu à mobiliser les plasmides β -lactamases et le gène de résistance à la tétracycline (*tet M*). La prédominance des souches hébergeant le plasmide 37,7 Kb vient avec d'autres déterminants de la résistance médiée par les plasmides. Ceci suggère que ce plasmide facilite le transfert des plasmides codant pour la résistance. Des chercheurs ont observé

que les souches qui sont les plus aptes à recevoir les plasmides de la β -lactamase sont celles qui possèdent le plasmide conjugatif (Robert et Falkow, 1977).

Un plasmide de poids moléculaire > 16.21 Kb est observé dans 9/12 souches pour lesquelles il est difficile d'interpréter le rôle. Tous les isolats du Cameroun ont une bande 3.99 Kb qui serait le plasmide cryptique. Ce plasmide a été observé dans 100% des isolats étudiés au Canada et dans d'autres études. La fonction de ce plasmide reste encore inconnue (Anonymes, 1990b).

Le plasmide de 38,8Kb est caractéristique de la résistance élevée de la tétracycline. Malheureusement, nous n'avons pas fait une étude poussée afin de déterminer le gène responsable *tet M*. Cette résistance est rapportée la première fois en 1985 (Anonymes, 1985). Elle est induite à travers un plasmide conjugatif, lequel porte le déterminant *tet M*. Ce déterminant code pour une protéine qui protège la translation dans une voie non définie. Il est capable d'assurer son propre transfert (Ikeda et coll., 1986).

L'analyse des profils des protéines de la membrane externe sur SDS-PAGE montre une expression variable de la PII (21,5 kDa) parmi toutes les souches étudiées de *N. gonorrhoeae* isolées au Cameroun. Il serait difficile d'associer la présence de PII avec la résistance aux antibiotiques quoiqu'il n'existe pas de variation dans l'expression de la protéine PI. Cette analyse ne peut permettre d'exclure le phénomène d'altérations dans la diffusion des antibiotiques à travers la porine comme un mécanisme possible de résistance

aux antibiotiques hydrophiles. D'autres études plus poussées seraient nécessaires pour confirmer la présence de chaque altération.

Une série d'altération et d'acquisition de facteurs de résistance serait à l'origine de la résistance de cette bactérie. Ceci explique le processus de sélection observé sous la pression des antibiotiques. Ce complexe amènerait à cette population une résistance très élevée de *N. gonorrhoeae* au Cameroun.

Il est admis que cet échantillonnage relativement limité des souches ne peut représenter adéquatement la situation nationale au Cameroun relative à la multirésistance de *N. gonorrhoeae*.

Ces souches sont recueillies dans deux zones urbaines du Cameroun. Les niveaux de résistance ou de circulation peuvent varier d'une région à une autre. Mais ces données montrent clairement que les souches multirésistantes de *N. gonorrhoeae* sont bien présentes dans les deux régions de ce pays. Elles peuvent être disseminées à d'autres régions du monde. Quant à l'intérieur du pays, cette information est alarmante, elle invoque un besoin crucial de mettre l'accent sur l'établissement des programmes de surveillance de la résistance aux antibiotiques partout au Cameroun dans le but d'éviter les échecs de traitements et la propagation de ces souches résistantes de *N. gonorrhoeae* non seulement à l'intérieur du pays, de l'Afrique, mais aussi dans le monde entier.

En général, des différences importantes ont été observées en comparant les résultats de l'étude des deux groupes de souches. Au niveau de la sensibilité aux six antibiotiques étudiés, on observe que les souches du Cameroun présentent un plus haut niveau de résistance. L'analyse de la résistance aux antibiotiques de type β -lactamines, montre que les souches du Cameroun sont résistantes à 56,7% contre 24% de celles du Canada. Cette résistance serait due principalement à la présence de plasmides codant pour une β -lactamase de type TEM-1. Pour la résistance plasmidique chez les souches du Canada, comme nous l'avons mentionné plus haut, elle présente un pourcentage élevé de résistance. Celui-ci n'est pas représentatif de la prévalence réelle.

Un rapport provenant du Laboratoire National Canadien sur les maladies transmises sexuellement a montré que sur la totalité des cas de gonorrhée au Québec, la proportion attribuable à ce type de résistance a doublé de 1987 à 1988, passant de 2,3 à 5,7% (RHMC, 1990). De ces cas à PPNG, 92% ont été observés dans trois régions urbaines, soit 69% dans la seule région de Montréal, suivie de la région située au sud de Montréal (13%) et celle de l'agglomération de Québec avec 10% des cas. Un autre rapport provenant du Relevé des maladies transmissibles au Canada montre que les souches résistantes de *N. gonorrhoeae* productrices de pénicillinase représentaient 11% de tous les cas de gonorrhée signalées en 1990. En 1995, cette proportion atteignait 23%. Jusque là cette l'incidence demeure très faible. Selon ces données, l'incidence réelle d'infections à PPNG dans la région de Québec serait de 0,57%. Excluant les PPNG, la résistance de bas niveau à la pénicilline (résistance chromosomique) n'est pas fréquente chez les souches du Québec. Par contre le laboratoire national pour les MTS, montre que le nombre de souches résistantes de *N. gonorrhoeae* chez les cas déclarés est à la hausse

au Canada. En 1995, on a signalé 128 cas d'infection à *N. gonorrhoeae* résistants à la pénicilline, 223 cas d'infections à *N.gonorrhoeae* résistantes à la pénicilline et à la tétracycline. Au Cameroun les souches PPNG n'ont pas cessé de se propager. Une seule étude a montré que le nombre de PPNG est passé de 32,28% en 1984 à 53,68% en 1987 (B.T.Abong et coll., 1991). Les tests de sensibilité à la tétracycline montrent qu'il existe des différences très marquées vis-à-vis de cet antibiotique entre les deux groupes de souches étudiées.

Chez les souches du Cameroun cette résistance est observée chez 26/30 (86,7%) des isolats, incluant les deux types de résistance, soit la résistance plasmidique (très élevée : 96,2% avec la $CMI_{90} \geq 32 \mu\text{g/ml}$) et chromosomique (bas niveau) chez une seule souche avec la $CMI=8 \mu\text{g/ml}$, contrairement aux souches du Canada, où l'incidence de la résistance chromosomique à la tétracycline s'est chiffrée à 90% des souches résistantes à la tétracycline avec une CMI égale à $2 \mu\text{g/ml}$.

Au Cameroun, tout comme dans plusieurs pays en voie de développement le diagnostic des infections génitales d'origine bactérienne est fréquemment réalisé sans l'aide d'examen de laboratoire, principalement dans le cas des infections à *Chlamydia* et à gonocoques. Les manifestations cliniques de ces deux maladies sont très semblables, et la possibilité qu'elles se présentent de façon simultanée est grande (Batteiger et coll., 1989; Hook et Holmes, 1985). Pour ces raisons la tétracycline est utilisée pour traiter les infections concomittantes et plusieurs autres infections bactériennes. Au Canada, les conditions de diagnostic et les traitements sont différents, ce qui expliquerait les

différences de résultats de tests de sensibilité obtenus pour la tétracycline dans les deux pays. Par ailleurs, un contrôle plus serré par les programmes de surveillance mis en place et une grande disponibilité de soins (Canada) expliqueraient également les différences observées des niveaux de résistance dans ces deux groupes géographiques. Il est connu que la résistance aux antibiotiques n'est pas statique et que les gènes de résistance peuvent se transmettre entre les souches d'une même espèce ou d'espèces différentes. Cette acquisition de résistance chez *N. gonorrhoeae* peut se faire via les mécanismes de transformation et/ou de transposition.

A l'exception, d'une souche 17GA qui montre une CMI ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ à la ceftriaxone et à la cefixime, toutes les autres sont sensibles à ces antibiotiques. Tous les isolats sont sensibles respectivement à la ceftriaxone, cefixime, spectinomycine, ciprofloxacine. Ces quatre antibiotiques ne sont presque pas utilisés au Cameroun pour le traitement des infections à gonocoques. Un seul type de plasmide approximatif caractéristique de la résistance a été retrouvé, le type asiatique au Cameroun et au Canada. Cette observation suggère que les isolats ayant déjà acquis ce plasmide de résistance (type asiatique) seraient importés de cette région à l'autre respectivement. (Falk et coll., 1988; Roberts et Falkow, 1979; Anonymes, 1988).

Des facteurs tels que le sexe, les habitudes sexuelles, la race et le lieu anatomique de l'infection, montrés comme étant liés à la variation chez les souches de *N. gonorrhoeae* (Whittington et Knapp, 1988; Knapp et coll., 1978; Reid et Young, 1984) pourraient être associés à d'autres paramètres spécifiques. Ceux-ci restent à découvrir dans le cas des souches du groupe B. Les souches du Canada présentent un profil

plasmidique en accord avec les observations faites par les chercheurs cités plus haut. Chez les deux groupes, on observe une prédominance du sérotype WII/III indépendamment de la sensibilité aux antibiotiques.

Cette classe de sérotype a été rapportée par plusieurs chercheurs comme étant la plus fréquente chez les souches résistantes. Il apparaît que le sérotype n'est pas une caractéristique stable, contrairement à ce qui a été longtemps considéré.

Il est possible que le sérotype soit aussi influencé par des facteurs non identifiés jusqu'à présent. Les profils électrophorétiques des protéines de la membrane externe sont semblables chez les deux groupes de souches. Il est probable que des études plus approfondies de la membrane externe, plus spécifiquement au niveau des porines puissent démontrer des différences chez les souches du Cameroun.

Cette étude confirme les observations d'autres chercheurs en relation avec la variabilité des caractéristiques chez *N. gonorrhoeae* selon les régions géographiques. D'où l'importance de suivre l'évolution de ces caractéristiques, ce qui par la suite pourra permettre une meilleure planification des programmes de contrôle des infections causées par ce microorganisme. De plus, la diffusion de ces caractéristiques pourra sensibiliser les professionnels du corps médical et tirer la sonnette d'alarme à la population. Nous avons eu des similarités et surtout des différences au niveau des caractéristiques de ce microorganisme, ainsi la connaissance de ces données pourra permettre aux deux pays soit de mieux contrôler les souches importées au niveau des programmes de surveillance,

soit d'en créer là où l'existence fait défaut à fin de mieux traiter les infections à gonocoques et de pouvoir contrôler les souches multirésistantes respectivement.

5. Conclusion

Les nouvelles connaissances acquises au cours du présent travail, nous permettent de conclure que :

les souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada sont plus sensibles à la pénicilline comparativement à celles du Cameroun; la résistance serait plus de type chromosomique au Canada par contre elle serait plus plasmidique au Cameroun.

La production de la β -lactamase pourrait être responsable de la résistance à la pénicilline observée dans les deux pays. Le sérotypage nous a permis de constater que le sérotype WII/III est prédominant à la fois chez les souches sensibles et résistantes dans les deux pays. Il nous apparaît difficile d'attribuer cette résistance aux protéines de la membrane à cause de sa présence aussi bien chez les souches sensibles que résistantes. Le plasmide caractéristique d'Asie a été trouvé aussi bien dans le groupe A que dans le groupe B d'où la nécessité de programmes de surveillance pour contrôler l'émergence des souches ayant acquis des facteurs de résistance dans d'autres pays. Des plasmides moins fréquents ont été observés dans les deux groupes.

Au cours de ce travail, nous avons ressorti les caractéristiques des souches de *N. gonorrhoeae* isolées au Canada et au Cameroun. Celles-ci permettent de constater que la résistance aux antibiotiques serait plus liée à l'acquisition des plasmides R, car nous avons retrouvé les plasmides caractéristiques de cette résistance selon la littérature, à

l'exception de la résistance très élevée de la tétracycline dont nous n'avons pas isolées le gène déterminant *tetM*. Une étude approfondie avec un échantillonnage important permettrait d'en tirer de plus amples conclusions. Un autre facteur favorisant cette résistance élevée serait due à la consommation abusive et incontrôlée des agents antimicrobiens. A l'heure actuelle, l' Afrique constitue un foyer des souches résistantes, avec pour risque, la propagation de celles-ci dans le monde et chez d'autres espèces pathogènes tel que le *Neisseria meningitidis*.

Nous espérons que ces données contribuent à une meilleure connaissance des souches de *N. gonorrhoeae* provenant de ce pays, et par conséquent permettent d'élaborer des mesures de contrôle plus appropriées.

6. Références

Abong BT, Fonkoua MC, Guibourdenche M, Riou JY, Ndayo WM et Garringue G. 1991. Analyse de 90 souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées à Yaoundé de 1984 à 1987 : auxotypes, contenus plasmidiques, sensibilité aux antibiotiques. Bull Soc Pathol Exot. **84** : 136-144.

Anonymes. 1996. Emergence de souches de *Neisseria gonorrhoeae* présentant une sensibilité réduite à la ciprofloxacine. Québec, 1994-1995.

Anonymes. 1997. Tendances concernant la gonorrhée au Canada, 1990-1995.

Anonymes. 1990. Les infections à *Neisseria gonorrhoeae* producteur de pénicillinase au Québec : Évaluation de la situation pour l'année 1998.

Anonymes. 1990. Augmentation du nombre des isolats de *Neisseria gonorrhoeae* présentant une double résistance à médiation plasmidique à la tétracycline et à la pénicilline.

Anonymes. 1991. Premiers isolats canadiens de *Neisseria gonorrhoeae* producteur de pénicillinase (NGPP) résistant à la norfloxacine.

Apicella MA, Westerink MA, Morse SA, Schneider H, Rice PA et Griffiss JM. 1986. Bactericidal antibody response of normal human serum to the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae*. J Infect. Dis. **153** : 520-526.

Ashfort, W. A., D. W. Pott., H et J. U. Adams. 1981. Spectinomycin resistant penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet 2 :1035-1037.

Ashford WA, Golash RG et Hemming VG. 1976. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet. 2 : 657-658.

Barbour, A. G. 1981. Properties of Penicillin- Binding Proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents and Chemother. **19** :316-322.

Batteiger, B. E., J. Fraiz, W. J. Newhali V, B. P. Kartz et J. B. Jones. 1989. Association of recurrent chlamydial infection with gonorrhoeae. J. Infect. Dis. **159**. 661-669.

Birnboim HC et Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** : 1513-1523.

Biswas, G. D., T. Sox, E. Blackman, et P.F. Sparling. 1977. Factors affecting genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **129** : 983-992.

Blake, M. S., E. C. Gotschlich., J. Swanson. 1981. Effects of proteolytic enzymes on the outer membrane proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **33** : 212-222.

Blake, M. S 1985. Functions of the outer membrane proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* **159** :452-462

Blog J.B., Chang A., De Koning G .A.Z., Oranje A.P., Stolz E., Bosscher-Koetsier G., De Jonge-Suy M.P.E., Michiel M.F., O'Neil E., De Weerd-Van Ameyden S et Gaastra L. 1977. Penicillinase producing strains of *N. gonorrhoeae* isolated in Rotterdam. *Brit.J. Vener. Dis.,* **5** : 98-150.

Bogaerts J, Tello WM, Akingeneye J, Mukantabana V, Van Dyck E et Piot P. 1993. Effectiveness of norfloxacin and ofloxacin for treatment of gonorrhoeae and decrease of in vitro susceptibility over time in Rwanda. *Genitourin Med.* **69** : 196-200.

Bogaerts J, Tello WM, Verbist L, Piot P et Vandepitte J. 1987. Norfloxacin versus thiamphenicol for treatment of uncomplicated gonorrhoea in Rwanda. *Antimicrob Agents Chemother.* **31** : 434-437.

Bowmer M.I., Leggat I., Barrowman J.A. 1982. Disseminated gonococcal infection. *Can. Med. Assoc.J.* **126** (10) : 1180-1190.

Breath, M. 1989. A novel gonococcal β -lactamase plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23** : 653-666.

Britigan BE, Chai Y et Cohen MS. 1985. Effects of human serum on the growth and metabolism of *Neisseria gonorrhoeae* : an alternative view of serum. *Infect. & Immun.* **50** : 738-744.

Bruton, J., D Clare., M A. Meier. 1986. Molecular epidemiology of antibiotic resistance plasmids of *Haemophilus species* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Rev. Infect. Dis.* **8** : 713-724.

Bruton, J., M. Meier, N. Ehrman, I. Maclean., L. Slaney. 1982. Molecular epidemiology of β -lactamase- specifying plasmids of *Haemophilus ducreyi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21** : 853-863.

Brooks, G. F., K. S. Israel et B. H. Petersen. 1976. Bactericidal and opsonic activity against *Neisseria gonorrhoeae* in sera from patients with disseminated gonococcal infection. *J. Infect. Dis.* **134** : 450-462.

Buchanan, T. M. et J.F. Hildebrandt. 1981. Antigen-specific serotyping of *Neisseria gonorrhoeae* : characterization based upon principal outer membrane protein. *Infect. Immun.* **32** : 985-994.

Buchanan, T.M., W.A. Pearce et K.C.S. Chen. 1978. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* pili to human cells, and investigation of the chemical nature of the receptor for gonococcal pili. **Dans** *Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae*. **Edité par G.F. Brooks, E.C. Gotschilch, K.K Hommes, W.D. Savyer et F.E. Young.** American Society for Microbiology Washington D.C. pp. 242-249.

Bygdeman, S. 1981. Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in relation to serogroups. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.* **89** : 227-237.

Bygdeman, S., M. Backman, D. Danielsson et M. Norgren. 1982. Genetic linkage between serogroup specificity and antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.* **90** : 243-250.

Cannon, J. G. et P. F. Sparling. 1984. The genetics of the gonococcus. *Ann. Rev. Microbiol.* **38** : 111-133.

Cannon, J. G., W. J. Black, I. Nachamkin et P.W.Stewart. 1984. Monoclonal antibody that recognizes an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to most nonpathogenic *Neisseria* species. *Infect. Immun.* **43** : 994-999.

Cannon J. G., T.M. Buchanan et F. Sparling. 1983. Confirmation of association of protein I serotype of *Neisseria gonorrhoeae* with ability to cause disseminated infection. *Infect. Immun.* **40** :816-819.

Cannon, J.G., D.G. Klapper, E.Y. Blackman et P.F. Sparling. 1980. Genetic locus (*nmp-1*) affecting the principal outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **143** : 847-851.

Catlin, B. W 1973. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirement for gonococcal typing. *J. Infect. Dis.* **128** : 178.

Centers for Disease Control. 1985. Tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* Georgia, Pennsylvania, New Hampshire. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* **34** : 563-4, 569-70.

Centers for Disease Control. 1990. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. United States, 1988 and 1989. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **39** : 284-7, 293.

Centres for Disease Control. 1976. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *MMWR.* **25** : 261.

Clendennen III, T. E., C. S. Hames, E. S. Kees, F. C. Price, W. J. Ruepple, A. B. Andrada, G. E. Espinoza, G. Cabrera, et F. S. Wigdall. 1992. In vitro antibiotic susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in the Phillipines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** : 277-282.

Danielson D 1990. Gonorrhoeae and syphilis in Sweden : past and present. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **69** : 69-76.

Dense, P., L.A. Mackeen et R. A. Clark. 1982. Dissemination of gonococcal infection is associated with delayed stimulation of complement-dependent neutrophil chemotaxis in vitro. *Infect. Immun.* **38** : 563-572.

Diaz J.L., Heckels J.E. 1982. Antigenic variation of outer membrane protein II in colonial variants of *Neisseria gonorrhoeae* P9. *J. Gen. Microbiol.* **128** (3) : 585-591.

Dillon J.R, Pauzé M et Yeung K-H. 1986. Molecular and epidemiological analysis of penicillinase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Canada 1976-1984 : evaluation of new auxotypes and β -lactamase encoding plasmid. *Genitourin Med.* **62** : 151-157.

Draper, D.L., J.F. James, G.F. Brooks et R. L. Sweet. 1980. Comparaison of virulence markers of peritoneal and fallopian tube isolates with endocervical *Neisseria gonorrhoeae* isolates from women with acute salpingitis. *Infect. Immun.* **27** : 882-888.

Dougherty, T. J., A. E. Koller, and A. Tomasz. 1980. Penicillin- binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18** :730-737.

Dougherty, T. J., A. E. Koller et A. Tomasz. 1981. Competition of beta-lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20** : 109-114.

Dougherty, T. J. 1985. Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to β -lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28** : 90-95.

Dougherty, T. J. 1986. Genetic analysis and penicillin-binding protein alterations in *Neisseria gonorrhoeae* with chromosomally mediated resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30** : 649-652.

Doward, D. W., C. F. Garon, et R. C. Judd. 1989. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171** : 2499-2505.

Embden JDA Van, Dessens-Kroon M et Klingerren B Van. 1985. A new β -lactamase plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob Chemother.* **15** : 247-258.

Elwell L. Roberts M., Mayer L.W et Falkow S. 1977. Plasmid-mediated beta-lactamase production in *N.gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11** : 528-533.

Falk, E. S., S. M. Bygeman, N. K. Birkeland, B. Bjorvatn, I. Kallings. et E.G. Stonström. 1988. Genotypes and phenotypes of β -lactamase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* from African countries. *Genitourin. Med.* **64** : 226-232.

Faruki, H., et P. F. Sparling. 1986. Genetics of resistant in non- β -Chemotherapy. **30** : 856-860.

Faruki, H., R. N. Khomeschert. P. Mckinney et P. F. Sparling. 1985. A community-based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally-mediated resistance). *N. Engl. J. Med.* **313** : 607-611.

Foster, T. J 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* **43** : 361-409.

Gascoyne D. M., J. Heritage, P. M. Hawkey, A Turner et B. van Klingerren. 1991. Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying *TetM* found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**. 173-183.

Gascoyne D, Heritage J et Hawkey P. 1990. The 25.2 MDa tetracycline-resistance plasmid is not derived from the 24.5 MDa conjugative plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob Chemother.* **25** : 39-47.

Genco CA, Knapp JS et Clark VL. 1984. Conjugation of plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* to other *Neisseria* Species : potential reservoirs for the β -lactamase plasmid. *J Infect Dis.* **150** : 397-401.

Gilbaugh J H., Fuchs P.C. 1979. The gonococcus and the toilet seat. *New. England. J. Med.* **301** (2) : 91-93

Gonzales, A.H. et G.R. Vela. 1984. Effect of uracil on colonial morphology of *Neisseria gonorrhoeae*. *Cur. Microbiol.* **11** : 257-260.

Goodhart, M.E., Ogden, E., Zaidi, A.A., Kraus, S.J. 1982. Factors affecting the performance of smear and culture tests for the detection of *Neisseria gonorrhoea*. *Sex. Transm. Dis.* **9** (2) : 63-69.

Gotschlich, E. C. 1980. The Neisseria. Dans *Microbiology*. 3^{ième} édition. **Edité par B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen et H. S. Ginsberg.** Harper and Row. Hagerstown. Pp 635-644.

Graves JS, Biswas GD et Sparling PF. 1982. Sequence-specific DNA uptake in transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* **152** (3) : 1071-1077

Griffiss JM, Schneider H, Mandrell RE, Yamasaki R, Jarvis GA, Kim JJ, Gibson BW, Hamadeh R, et Apicella MA. 1988. Lipooligosaccharides : the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev. Infect. Dis.* **10** sup 2 : S287-295.

Guymon, L.F., D.L. Wlastad et P.F. Sparling. 1978. Cell envelope alterations in antibiotic-sensibilive and-resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **136** : 391-401

- Hallett A.F., Appelbaum P.C., Cooper R., Mokgokong S et Monale D.** 1977. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* form South Africa., **1** : 1205
- Handsfield HH, McCormack WM, Hook EW II, et Anonymes.** 1991. A comparison of single-dose cefixime with ceftriaxone as treatment for uncomplicated gonorrhoea. The Gonorrhoea Treatment Study Group. *N Engl J. Med.* **325** : 1337-1341.
- Hansen M.V., Wilde C.E.** 3d. 1984. Conservation of peptide structure of outer membrane protein-macromolecular complex *from Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **43** : 839-845.
- Harrison WO, Wignall FS, Kerbs SBJ et Berg SW** 1984. Oral rosoxacin for treatment of penicillin-resistant gonorrhoea. *Lancet*; **1** : 566.
- Heckels, J. E.** 1977. The surface properties of *Neisseria gonorrhoeae* : isolation of the major components of the outer membrane. *J. Gen. Microbiol.* **99** : 333-341.
- Heckels, J. E.,** 1984. Molecular studies on the pathogenesis of gonorrhoea. *J. Med. Microbiol.* **18** : 293-307.
- Heckels, J E.,** 1981. Structural comparison of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **145** : 736-742.
- Hildebrandt, J. F. et T.M. Buchanan.** 1978. Identification of an outer membrane protein associated with gonococci capable of causing disseminated infection. Dans *Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae*. Edité par **G. F. Brooks, E.C. Gtschilch, K.K. Holmes, W. D. Sawyer et F.E. Young.** American Society for Microbiology, Washington D. C. p : 138.

Hook EW., Holmes KK. 1985. Gonococcal infections. *Annals Inter. Med.* **102** : 229-243.

Ikeda, F., A. Tsuji, Y. Kaneko, M. Nishida, and S. Goto. 1986. Conjugal transfer of beta-lactamase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* to *Neisseria meningitidis*. *Microbiol. Immunol.* **30** : 737-742.

Ison, C. A., C. M. Beillinger, and J. Walker. 1986. Homology of cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmids from *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *J. Clin. Pathol.* **39** : 1119-1123.

Ison CA et Easmon CSF. 1991. Epidemiology of penicillin resistant of *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin Med.* **67** : 307-311.

Ison CA, Bindayana KM, Woodford N, Gill MJ et Easmon CSF. 1990. Penicillin and cephalosporin resistance in gonococci. *Genitourin Med.* **66** : 351-356.

Ison CA, Littleton K, Shannon KP, Easmon CSF et Phillips I. 1983. Spectinomycin resistant gonococci. *BMJ [Clin Res].* **287** : 1827-1829.

Jahn G, Bialasiewicz AA et Blenk H. 1985. Evaluation of plasmids in tetracycline resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma urealyticum* in a case of severe urethritis. *Europ. J. Epidemiol.* **1** : 294-300.

Janik, A., E. Juni, and G. A. Heym. 1976. Genetic transformation as a tool for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **4** : 71-81.

James, J. F., C. J. Lammel, D. L. Draper, D. A. Brown, R. L. Sweet et G. F. Brooks. 1983. Gonococcal attachment to eucaryotic cells. *Sex. Transm. Dis.* **10** : 173-179.

James, J. F. et J Swanson. 1977. The capsule on the gonococcus. *J. Exp. Med.* **145** ; 1082-1086.

James, J. F. et J Swanson. 1978a. Studies on gonococcus infection : XIII. Occurrence of colour/opacity colonial variants in clinical cultures. *Infect. Immun.* **19** : 332-340.

James, J. F. et J Swanson. 1978b. Colour/opacity colonial variants of *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to the menstrual cycle. **Dans** Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*. Edité par G. F. Brooks, E. C. Gotschilch, K. K. Holmes, W. D. Sawyer et F. E. Young. American Society for Microbiology Washington D. C. pp. 338-343.

Jephcott. A.E. 1986. Epidemiology of resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**: 199-205.

Johnston, S. R et S. A. Morse. 1988. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* : Genetic and mechanisms of resistance. *Sex. Transm. Dis.* **15** : 217-224.

Johnston, K. H. et E. C. Gotschilch. 1974. Isolation and characterization of the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **119** : 250-257.

Johnston, K. H. , K. K. Holmes et E. C. Gotschilch. 1976. The serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* I. Isolation of the outer membrane complex responsible for the serotypic specificity. *J. Exp. Med.* **143** : 741-758. .

Joiner, K. A, K. A. Warren, C, Hammer et M. M. Frank. 1985. Bactericidal but not nonbactericidal C5b-9 is associated with distinctive outer membrane proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Immunol.* **134** : 1920-1925.

Jones RN, Gerlach EH, Koontz FP, Murray PR, Pfaller MA Washington JA Erwin ME et Knapp CC. 1991. Interpretive criteria and quality control guidelines for *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility test standardization for cefotetan. J Clin. Microbiol. **29** (2) : 363-366.

Joyce MP, Aying BB, Vaughan GH, Herip DS, Hayes CG, Espinosa G, et coll. 1988. In vitro sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to fluoroquinolone antibiotics in the Republic of the Philippines. Presented at the 6th International Pathogenic *Neisseria* Conference; Callaway Gardens, GA, Oct 16-21. Abstract E19.

Judd, R. C. 1982b. Surface peptide mapping of protein I and Protein III of four strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Infect. Immun. **37** : 632-641.

Knapp, J. S. , M. R. Tam, R. C. Nowinski, K. K. Holmes et E. G. Sandstrom. 1984. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I. J. Infect. Dis. **150** : 44-48.

Knapp, J.S. , C. Thornsberry, G. A. Schoolnik, P. J. Wiesner, K. H. Holmes et the cooperative study group. 1978. Phenotypic and epidemiologic correlates of auxotype in *Neisseria gonorrhoeae*. J. Infect. Dis. **138** : 160-165.

Knapp JS, Holmes KK, Bonin P et Hook EW. 1987. Epidemiology of gonorrhea : distribution and temporal changes in auxotype/serovar classes of *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Dis. **14** : 26-32.

Knapp J.S et Holmes K.K. 1975. Disseminated gonococcal infections caused by *Neisseria gonorrhoeae* with unique nutritional requirements. J.Infect. Dis. pp : 132-204

Knapp JS, Mesola V, Neal SW, Wi TE, Manalastas R, Perine PL, et coll. 1997. Molecular epidemiology, in 1994, of *Neisseria gonorrhoeae* in Manila and Cebu City, Republic of the Philippines. *Sex Transm Dis.* **24** : 1-7.

Koelbl JA et Catlin BW. 1986. Vancomycin hypersusceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients involves diverse mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29** : 687-695.

Laboratoire de lutte contre la maladie. Surveillance des maladies transmises sexuellement au Canada, 1995, Rapport annuel. *RMTC.* **24S1** : 1-32.

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

Lambden, P. R. 1982. Biochemical comparison of pili variants of *Neisseria gonorrhoeae*. P9. *J. Gen. Microbiol.* **128** : 2105-2111.

Lambden, P. R. et J. E. Heckels. 1979. Outer membrane protein composition and colonial morphology of *Neisseria gonorrhoeae* strain P9. *FEMS Microbiol. Let.* **5** : 263-265.

Lambden, P. R. , J. E. Heckels, L. T. James et P. J. Watt. 1979. Variations in surface protein composition associated with virulence properties in opacity types of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Gen. Microbiol.* **114** : 305-312.

Lambden, P. R. , J. N. Robertson et P. J. Watt. 1981. The preparation and properties of alpha et beta pili from variants of *Neisseria gonorrhoeae* P9. *J. Gen. Microbiol.* **124** : 109-117.

Lassau F, Casin I, Riou J.Y, Guibourdence M, Allouch V et Morel P. 1987. Réévaluation du traitement minute par le thiamphénicol et la spectinomycine des uréthrites gonococciques masculines non compliquées. *Ann Dermatol Venereol.* **114** : 941-946.

Latif AS, Marowa E, Mason PR et Anonymes. 1986. Treatment of infection due to penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* with oral thiamphenicol and with oral lymecycline. *Sex Transm Dis.* **13** : 156-158

Lind I. 1997. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clinical infectious Diseases.* **24** (suppl1) : S93-97.

Lind. I. 1990. Epidemiology of antibiotic resistant *Neisseria gonorrhoeae* in industrialized and developing countries. *Scand. J. Infect. Dis; Suppl.* **69** : 77-82.

Maier TW, Zubrzycki L, Coyle MB, Chila M et Warner P. 1975. Genetic analysis of resistance in *Neisseria gonorrhoeae*; production of increased resistance by the combination of two antibiotic resistance loci. *J Bacteriol.* **124** : 834-842.

Maniatis, T, Fritsch, E. F. et Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

McDade, R. L. et K. H. Johnston. 1980. Characterization of serologically dominant outer membrane proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **141**: 1183-1191.

McGee, Z. A. 1984. Gonococcal pelvic inflammatory disease. **Dans** Sexually Transmitted Diseases. **Edité par Holmes, K. K. , P. Mardh, P. F. Sparling et P. J. Wiesner.** McGraw-Hill. New York. pp. 220-229.

McNicol PJ, Albritton WL et Ronald AR. 1983. Characterization of ampicillin resistance plasmids of *Haemophilus ducreyi* and *Neisseria gonorrhoeae* with regard to location of origin of transfer and mobilization by a conjugative plasmid of *Haemophilus ducreyi*. *J Bacteriol.* **156** : 437-440.

Miller M.A., Anderson P., Parker J.W., Rohrer H.H. 1982. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* isolates by Martin-Lewis medium. Epidemiology, susceptibility profile, and plasma analysis. *Brit. J. Vener. Dis.* **58** : 96-100.

Moran JS et Zenilman JM. 1990. Therapy for gonococcal infections : options in 1989. *Rew. Infect.Dis.* **6** : s633-644

Morello, J.A. S.A. Lerner et M. Bohnoff. 1976. Characteristic of typical *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and localized infection. *Infect. Immun.* **13** : 1510-1516.

Morello, J.A., S.A. Lerner et M. Bohnoff. 1980. *Neisseria gonorrhoeae* and Branhamella. Dans *Manual of Clinical Microbiology*. **Edité par Lennette, E.H., Balows, W.J. Hausler Jr et J.P. Truant.** American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 111-130.

Morse, S. A. 1979. The biology of the gonococcus. *CRC Crt. Rev. Microbiol.* **7** : 93-189.

Morse SA, Johnson SR, Biddle JW et Roberts MC. 1986. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM detreminant. *Antimicrob Agents Chemother.*, **30** : 664-670.

Morse, S.A et P.G. Lysko. 1980. The cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae*. Dans *Genetics and Immunobiology of pathogenic Neisseria*. **Edité par Danielsson, D. et S. Normark.** Université d'Umea, Suède. Pp. 1-6.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that aerobically; approved standard M7-A4, 4th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940W. West Valley Road, Suite 1400, Wayne. Pennsylvania. 1898-19087.

National Committee for clinical Laboratory Standards. 1990. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically 2nd ed. Approved Standard. NCCLS Document M7-A2. Villanova Pennsylvania.

Neilands J.B. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* **36** : 285-309.

Newhall, W.J., C.E. Wilde III, W.D. Sawyer et R.A. Haak. 1980. High-molecular-weight antigenic protein complex in the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **27** : 475-482.

O'Brien, J.P., D.L. Goldenberg et P.A. Price. 1983. Disseminated gonococcal infection : a prospective analyse of 49 patients and a review of pathophysiology and immune mechanisms. *Medecine.* **62** : 395-406

Odegaard K et Solberg O. 1976. Isolation of a penicillinase producing strain of *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **84** : 458-460.

Odugbemi T.O., Brown ST., Biddle., Johnson S., Perkins G., Dewitt W et Albritton WL. 1983. Plasmid profile, serogrouping and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Africa. *Br J Vener Dis.*, **59** : 41-43.

Odugbemi, T.O. et S. Hafiz. 1978. The effect of iron chelators on the colonial morphology of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Gen. Microbiol.* **104** : 165-167.

Palomares JC, Lozano MC et Perea EJ. 1990. Antibiotic resistance, plasmid profile, auxotypes, and serovars of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Sevilla (Spain). *Genitourin Med.*, **66** : 87-90.

Pariser H., Marino, A. F., Hand, C. 1982. Analysis of a recent epidemic due to penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* : epidemiologic and medical considerations. *Sex. Transm. Dis.* **9 (3)** : 132-134.

Percival A., Rowlands J., Corkill J. E., Alergant C.D., Arya O.P., Rees E et Annels E.H. 1976. Penicillinase producing gonococci in Liverpool. *Lancet.*, **2** : 1377-1382.

Perine P., Thornsberry C., Schalla W., Biddle J., Siegel M.S., Wong K.H. et Thompson S.E. 1977. Evidence for two distinct types of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet.*, **2** : 993-995.

Phillips I. 1976. Beta-lactamase producing penicillin resistant gonococcus. *Lancet*, **2** : 993-995.

Pierre. Harbec et Pierre Turcotte. 1996. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at -20° C. *J. Clin. Microb.* p. 1143-1146.

Piot P. 1977. Resistant gonococcus from the Ivory Coast. *Lancet.*, **1** : 857.

Piot P et Tezzo R. 1990. The epidemiology of HIV and other sexually transmitted infections in the developing world. *Scand. J. infect. Dis.* **69** : 89-97.

Plaut AG, Gillbert JV, Artenstein MS et Capra JD. 1975. *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* : extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science.* **190 (4219)** : 1103-1105.

Plourde PJ, Tyndall M, Agoki E et Anonymes. 1992. Single-dose cefixime versus single-dose ceftriaxone in the treatment of antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* infection. *J. Infect. Dis.* **166** : 919-922.

Punsalang, A.P., Jr et W. D. Sawyer. 1973. Role of pili in the virulence of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **8** : 255-263.

Ravaoarino M, Ciurli C, Toma E et Morisset R. 1994 : Rapid method for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrophoresis.* **15** : 594-596.

Rice RJ et Knapp JS. 1994. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* associated with pelvic inflammatory disease to cefoxitin, ceftriaxone, clindamycin, gentamicin, doxycycline, azithromycin, and other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **38** : 1688-1691.

Rice RJ, Biddle JW, Jean Louis YA, DeWitt WE, Blount JH et Morse SA. 1986. Chromosomally-mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States; results of surveillance and reporting, 1983-1984. *J Infect Dis.* **153** : 340-345.

Reid KG et Young H. Serogrouping *Neisseria gonorrhoeae* : correlation of coagglutination sérogroup WII with homosexually acquired infection. *British Journal of Venereal Diseases.* **60** : 302-305.

Reyn A, Korner B. et Bentzon M.W. 1958. Effect of penicillin, streptomycin and tetracycline on *Neisseria gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. *Brit. J. Vener. Dis.* **34** : 227-239.

Roberts M., Elwell L.P et Falkow S. 1977. Molecular characterization of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. Nature (London), **266** : 630-631.

Roberts M et Falkow S. 1977. Conjugal transfer of R plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. Nature., **266** : 630-631.

Robert, M., P. Piot et S. Falkow. 1979. The ecology of gonococcal plasmids. J. Gen.Microbiol. **114** : 491-494.

Roberts M.C, Wagenvoort JHT, Klingeren B Van et Knapp JS 1988. TetM and beta-lactamase containing *Neisseria gonorrhoeae* (tetracycline resistant and penicillinase producing) in the Netherlands. Antimicrob. Agents Chemother., **32** : 158.

Ronal A, Peeling R. 1993. Les infections transmises sexuellement : leurs manifestations et leurs liens avec l'infertilité et les maladies de l'appareil reproducteur. Dans : compréhension de l'infertilité : facteurs de risque. Collection d'études de la Commission royale d'enquête sur les nouvelles techniques de reproduction, Volume 7. Ottawa : Ministère des Approvisionnement et services Canada. 1-31.

Salit, I.E. et M. Bond. 1982. Gonococcal opacity variants : susceptibility to antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. **22** : 515-517.

Sandström E.G et Danielsson D. 1980. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*. Classification by co-agglutination. Acta Pathol Microbiol Scand (B). **88** : 27-38.

Sarrubbi FA, Sparling PF, Blackman E et Lewis E. 1975. Loss of low level antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* due to env mutations. J Bacteriol. **124** : 750-756.

Sarrubbi FA, Blackman E, et Sparling PF. 1974. Genetic mapping of linked antibiotic resistance loci in *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. **120** : 1284-1292

Schwarcz SK, Zenilman JM, Schnell D, Knapp. J. S, Hook Ewsd, Thompson S, Jadson F N et Holmes K. K. 1990. National Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. The Gonococcal Isolate Surveillance Project. JAMA. **264** : 1413-1417.

Siboulet A. 1972. Resultats of the minute treatment of gonorrhoea in 26.339 cases. Postgrad Med J. 48 (SUPPL 1) : 65-70.

Shneider H.,Hale TL., Zollinger WD., Seid Rc Jr., Hammack CA et Griffiss JM. 1984. Heterogenety of molecular size and antigenic expression within lipooligosaccharides of individual strains of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. Infectio & Immunity. Sep; **45** (3) : 544-549.

Siegel M.S., Thompson S.E. et Perine P.L. 1977. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. Sex. Transm. Dis., **4** : 32-33

Shinners E.N., Catlin B.W. 1982. Arginine and pyrimidine biosynthetic defects in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from patients. J. Bacteriol. **151** : 295-302.

Shinners EN et Catlin BW. 1988. *Neisseria gonorrhoeae* recombinant strains expressing hybrid serological reactivities of outer membrane proteins IA and IB. J. Infect. Dis. **158** : 529-536.

Stead, A., J.S. Main, M. E. Ward et P.J. Watt. 1975. Studies on lipopolysaccharides isolated from strains of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Gen. Microbiol. **88** : 123-131.

Sparling P.F., Sarubbi F.A et Blackman E. 1975. Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. **124** : 740-749.

Spratt S.K., Jones F., Shockley T.E., Jackson J.H. 1980. Cotransformation of a serum resistance phenotype with genes for arginine biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae*. Infect. Immun. **29** : 287-289.

Stephens D.S., McGee Z.A., Melly M.A., Hoffman L.H., Gregg C.R. 1982. Attachment of pathogenic *Neisseria* to human mucosal surfaces : roles in pathogenesis. Infection. **10** (3) : 192-195.

Swanson, J. 1978a. Studies on gonococcus infection XII. Colony color and opacity variants of gonococci. Infect. Immun. **19** : 320-331.

Swanson, J. 1977. Surface components associated with gonococcal-cell interactions. Dans The gonococcus. Edité par Roberts, R.B. Wiley and sons. New York. pp. 369-401.

Swanson, J. Colony opacity and protein II compositions of gonococci. Infect. Immun. **37** : 359-368.

Swanson, J. et O. Berrera. 1983. Gonococcal pilus subunit size heterogeneity correlates with transitions in colony piliation phenotype, not with changes in colony opacity. J. Exp. Med. **158** : 1459-1472.

Sweet, R.L. 1981. Pelvic inflammatory disease : etiology, diagnosis, and treatment. Sex. Transm. Dis. **8** : 308-315.

Todd, W.J., G.P. Wray et P.J. Hitchcock. 1984. Arrangement of pili in colonies of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. **159** : 312-320.

Tramont, E.C. 1981. Adhesion of *Neisseria gonorrhoeae* and disease. Dans Adhesion and microorganism pathogenicity. Ciba foundation Symposium 80. Pitman Medical. Tunbridge Wells. pp. 188-201.

Turner G.C., Ratcliffe J.G et Anderson D. 1976. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet., 2 : 793.

Tzanakaki G, Mavrommati L, Tzelepi E Kolyva S et Fragouli E. 1989. Serological classification in relation to auxotypes, plasmid contents, and susceptibilities to antimicrobials of PPNG and non-PPNG strains isolated in Greece. Genitourin. Med. 65 : 171-6.

Virji M, et Heckels JE. 1989. Location of a blocking epitope on outer-membrane protein III of *Neisseria gonorrhoeae*. J Gen Microbiol. 135 : 1895-1899

Waner P.F., Zubrzycki L.J., Chila M. 1980. Polygene and modifier genes for tetracycline and penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. J. Gen. Microbiol. 117 (1) : 103-110.

Wang S.P, Holmes K.K, Knapp J.S, Ott S et Kyzer D.D. Immunologic classification of *Neisseria gonorrhoeae* with micro-immunofluorescence. J. Immunol 1977; 119 : 795-803.

Watt, P.J. et M.E. Ward. 1980. Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species to mammalian cells. Dans Bacterial adherence (Receptors and Recognition, Series B, volume 6). Edité par E.H. Beachey. Chapman and Hall. London. Pp.251-288.

Weström L. 1975. Effects of acute pelvic infectious disease on fertility. Am.J. Obstet. Gynecol. 121 : 707-713.

Wetzler LM., Gotschlich EC., Blake M.S 1989. The construction and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* lacking protein III in its outer membrane. *J. Exper. Med.* **169** (6) : 2199-2209.

Whittington WL et Knapp JS. 1988. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States. *Sex Transm Dis.* **15** : 202-210.

Woodford N, Bindayna KM, Easmon CSF et Ison CA. 1989. Associations between serotype and susceptibility to antibiotics of *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin Med.* **65** : 86-91.

Wright DJ et Daunt O. 1973. How infectious is gonorrhoea. *Lancet.* **1** (7796) : 208

Yeung K-H, Dillon JR, Pauzé M et Wallace. E. 1986. Outbreak of PPNG caused by a novel 3.05 MDa penicillinase-producing plasmid (Toronto-type) related to the Asian-type plasmid. *J Infect Dis.* **153** : 1162-1165.

Zenilman JM, Nims LJ, Menegus MA Nolte F et Knapp JS. 1987. Spectinomycin-resistant gonococcal infectiod in the United States, 1985-1986. *J. Infect. Dis.* **156** : 1002-1004.