



Prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez *Mycoplasma genitalium* en France d'Outre-Mer en 2018

Camille Michelle Cassiede

► To cite this version:

Camille Michelle Cassiede. Prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez *Mycoplasma genitalium* en France d'Outre-Mer en 2018. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03043305

HAL Id: dumas-03043305

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03043305>

Submitted on 7 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2020

Thèse n°:133

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par : Camille Michelle CASSIEDE

Née le 15/08/1994 à Cleveland aux Etats-Unis

Le (17/11/2020)

**PREVALENCE DE LA RESISTANCE AUX
MACROLIDES ET AUX FLUOROQUINOLONES CHEZ
MYCOPLASMA GENITALIUM EN FRANCE D'OUTRE
MER EN 2018**

Sous la direction de Sabine Pereyre-Wassner

Membres du jury : Pr Véronique Dubois, PU-PH

Président

Mme Françoise Penouil, Docteur en Pharmacie Examineur

Pr Sabine Pereyre, PU-PH

Directeur de thèse

Remerciements

À Madame Dubois Véronique, c'est un honneur que vous me faites de présider cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de juger ce travail. Veuillez y trouver l'expression de mes remerciements et de mon respect.

À Madame Pereyre Sabine, je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse. Vous avez toujours su vous montrer disponible et vos conseils tout au long de ce travail m'ont permis d'avancer sereinement.

À Madame Pucheu Françoise, c'est un réel plaisir que vous ayez accepté de participer à ce jury. Je vous en remercie.

À Chloé Le Roy, je te remercie pour ton accueil au sein du laboratoire de bactériologie, tes explications et ton implication dans la relecture de ce travail.

À Marie Gardette, j'ai passé de superbes stages à tes côtés, tu travailles toujours avec le sourire ce qui a été vraiment agréable et c'est grâce à toi que j'ai eu envie d'orienter ma thèse sur ce sujet. Merci à toi.

À Madame Anoufa Fabienne, de m'avoir encouragé durant l'élaboration de ce travail et de m'apprendre quotidiennement à m'améliorer en tant que pharmacienne d'officine.

À ma famille,

À mon père qui m'a aidé à en arriver là. Cela n'a pas toujours été facile mais je me rends compte que c'était nécessaire. Je tiens à te remercier pour toutes ces heures passées à réviser et à comprendre ces fameux cours de PACES et ta disponibilité tout au long de mes études.

À ma mère qui a été d'un grand soutien durant toutes mes années études et ce, même dans les moments difficiles. Je te remercie aussi pour avoir pris le temps de relire ma thèse.

J'espère que ce travail vous rendra fière de moi.

À ma sœur, à nos disputes, à nos réconciliations, à nos pleurs, à nos rires et à l'évolution de notre relation. Je suis soulagée que tu puisses continuer tes études à Bordeaux et j'espère que tu pourras faire le métier qui te plaît et t'épanouit tout comme moi.

À Yohan, merci d'être là pour moi, ce n'était pas toujours très simple de réaliser ce travail mais tu as continuellement su me motiver et me soutenir. J'espère que cela durera encore longtemps.

À mes ami(e)s,

À Sandra et à nos huit années de grande amitié et de complicité. Sans toi, les deux années de PACES auraient été compliquées, merci pour tes précieux conseils pour la rédaction de ma thèse et pour tous tes conseils de manière générale. Merci d'avoir été et d'être encore là. Par contre, tu oublies le canoë avec moi, je suis beaucoup trop jeune pour mourir ! Sinon, je continue à attendre tes cours d'espagnol figure-toi !

À Maïlys, alias Chacha, je remercie tes parents de t'avoir donné ce nom qui a permis que l'on soit durant quatre années binômes de TP même si parfois c'était électrique, nos caractères complémentaires nous ont toujours valu une bonne note. Merci à Katy qui nous a, malgré elle, rapproché, merci à nos fous rires qui nous ont servi à décompresser pendant nos révisions. Enfin, merci à toi tout simplement, je te *Papaver rhoeas*.

À Anne-Laure, à ta présence tous les samedis à la pharmacie, à ta bonne humeur et à ton brin de folie qui m'ont tout de suite plus et qui nous ont rapprochés. Je te souhaite bon courage pour la rédaction de ta thèse, tu tiens le bon bout !

À Noémie, à ta bienveillance et ton amitié depuis le lycée. Je suis heureuse que l'on se soit retrouvées après s'être un peu perdues de vue et j'espère que cela perdurera.

À Richina, Bryan et Thibaut, j'espère que l'on pourra continuer à se voir et à rigoler tout en faisant des sushis toujours dix fois trop gros.

À Émeline, Inès, Morgane et Noémie et à nos longues heures de préparations pour notre projet vidéo sur la gestion des ruptures en officine, cela nous a valu beaucoup de rires et même un prix lors de la remise des diplômes. Merci pour votre soutien et votre amitié.

À mes collègues, Marina, Martine et Isabelle, votre présence est un réel bonheur au quotidien.

SOMMAIRE

Table des abréviations.....	7
Table des figures.....	9
Table des tableaux.....	10
Introduction.....	11
Etude bibliographique sur <i>Mycoplasma genitalium</i>	13
I. Caractéristiques générales	13
II. Physiopathologie de <i>M. genitalium</i>	18
III. Pouvoir pathogène	22
IV. Diagnostic biologique	25
a) Prélèvements à effectuer	25
b) Culture	25
c) Détection par PCR.....	26
d) PCR de détection de la résistance	28
V. Antibiotiques actifs et résistances acquises.....	32
a) Antibiotiques actifs.....	32
➤ Macrolides et apparentés.....	32
➤ Fluoroquinolones.....	33
➤ Tétracyclines.....	34
➤ Autres possibilités de traitement en cours d'expérimentation	34
b) <i>M. genitalium</i> naturellement résistants à certains antibiotiques.....	35
c) Prévalence de la résistance et mécanismes de résistance.....	36
➤ Prévalence de la résistance	37
➤ Mécanisme de résistance aux macrolides.....	39
➤ Mécanisme de résistance aux fluoroquinolones.....	43
VI. Traitements et recommandations Européenne et Anglaise	48
a) Les recommandations Européennes de 2016	48
b) Les recommandations de la BASHH	53
Objectifs	56
Matériels et Méthodes.....	57
I. Patients et échantillons inclus dans l'étude	57
II. Extraits d'ADN et choix de la PCR.....	59
➤ Extraits d'ADN.....	59

➤ Choix de la PCR	59
III. Méthode de détection de la résistance aux macrolides	60
a) PCR FRET et séquençage de l'ARNr 23S	60
b) ResistancePlus® MG (SpeeDx).....	65
IV. Méthode de la détection de la résistance aux fluoroquinolones	67
➤ Mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones	70
Résultats	71
I. Epidémiologie de la cohorte ultra-marine	71
II. Résistance aux macrolides dans les territoires ultra-marins.....	77
III. Résistance aux fluoroquinolones dans les territoires ultra-marins	80
Discussion - Conclusion	83
Références.....	84

Table des abréviations

A : Adénine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ala : Alanine

Arg : Arginine

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

Asn : Asparagine

Asp : Acide aspartique

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BASHH : British Association of Sexual Health and HIV

C : Cytosine

CD4 : Cluster de Différenciation 4

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

Cys : Cystéine

DROM : Départements et Régions d'Outre-Mer

E : Echantillon

F : Femme

FDA : Food and Drug Administration

FQ : Fluoroquinolone(s)

FRET : Fluorescent Resonance Energy Transfer

G : Guanine

Gly : Glycine

H : Homme

His : Histidine

HSH : Homme ayant des relations Sexuelles avec d'autres Hommes

IL-6 : InterLeukine-6

Ile : Isoleucine

IST : Infection Sexuellement Transmissible

LAMP : Lipid-Associated Membrane Proteins

ND : Non Déterminé

PCR : Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérase

QRDR : Quinolone Resistance Determining Region

Ser : Sérine

T : Thymine

TAE : Tris-Acetate-EDTA

TLR : Toll Like Receptor

Tm : Temperature of melting

TNF : Tumor Necrosis Factors

TOC : Test Of Cure

Tyr : Tyrosine

UNG : Urérite Non Gonococcique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WT : Wild Type ou souche sauvage

Table des figures

Figure 1 : Classification de *M. genitalium*

Figure 2 : Observation au microscope électronique de *M. genitalium*

Figure 3 : Observation au microscope électronique de la phagocytose de *M. genitalium*

Figure 4 : 4a : Observation au microscope électronique du changement morphologique de *M. genitalium*

4b : Observation au microscope électronique de vésicules phagocytaires dénuées d'organismes intracellulaires

Figure 5 : Courbes de fusion obtenues après réalisation de la PCR de type FRET sur les souches mutées de *M. genitalium* et la souche sauvage G37

Figure 6 : Test multiplex SpeedX

Figure 7 : Planisphère de la prévalence en 2019 de la résistance aux macrolides, de la résistance aux fluoroquinolones et de la résistance aux deux classes macrolides et fluoroquinolones chez *M. genitalium*

Figure 8 : Traitement d'une infection par *M. genitalium* selon les recommandations Européennes

Figure 9 : Planisphère recensant la provenance des différents échantillons envoyés au CNR des IST de Bordeaux

Figure 10 : Courbes de fusion obtenues lors du programme d'amplification de la PCR de type FRET en fonction de la séquence de l'ARNr 23S amplifiée

Figure 11 : Provenance des échantillons en pourcentage

Figure 12 : Répartition des échantillons selon la localisation géographique et le sexe des patients

Figure 13 : Répartition des échantillons en fonction du sexe des patients et du site de prélèvement

Figure 14 : Résultats obtenus suite à une PCR de type FRET avec ou sans la technique SpeedX pour le dénombrement des mutations présentes dans la cohorte étudiée

Figure 15 : Résultats obtenus suite à une PCR en point final pour le dénombrement des mutations présentes dans la cohorte étudiée

Table des tableaux

Tableau 1 : Pathologies, symptômes et complications associés à une infection par *M. genitalium*

Tableau 2 : Variation des CMI des quatre fluoroquinolones en fonction des mutations rencontrées au niveau du gène *parC* de la topoisomérase IV de *M. genitalium*

Tableau 3 : Amorces utilisées lors de la PCR de type FRET

Tableau 4 : Sondes utilisées lors de la PCR de type FRET

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR de type FRET

Tableau 6 : Programme d'amplification pour réaliser la PCR de type FRET

Tableau 7 : Températures de fusion en fonction de la nature de la mutation

Tableau 8 : Programme d'amplification selon le kit *ResistancePlus*® MG

Tableau 9 : Amorces utilisées lors de la PCR en point final du gène *parC* selon Shimada *et al.*

Tableau 10 : Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR en point final du gène *parC*

Tableau 11 : Programme d'amplification pour réaliser une PCR en point final ciblant le gène *parC*

Tableau 12 : Mutations connues au niveau de la protéine ParC associée à la résistance aux fluoroquinolones chez *M. genitalium*

Tableau 13 : Répartition des échantillons en fonction de l'âge et du sexe du patient

Tableau 14 : Co-infection avec *C. trachomatis*

Tableau 15 : Répartition du statut VIH selon le sexe et la géolocalisation

Tableau 16 : Connaissance de la prise antérieure de macrolides par les patients du CHU de la Réunion

Tableau 17 : Provenance des différentes souches mutées en fonction de la nature de la mutation

Tableau 18 : Informations sur les patients présentant une souche mutée au niveau du gène de l'ARNr 23S

Tableau 19 : Informations sur les patients présentant une souche mutée au niveau de la protéine ParC

Tableau 20 : Statut mutationnel des échantillons présentant une mutation associée à une résistance antibiotique

Introduction

Chaque année, environ 340 millions de nouveaux cas d'infections sexuellement transmissibles (IST) sont recensés toutes IST confondues ce qui représente une préoccupation majeure de santé publique [1] puisque les IST bactériennes peuvent engendrer des complications telles que la syphilis congénitale, l'apparition d'infections génitales hautes ainsi qu'un risque accru de transmission du VIH mais aussi des séquelles comme l'infertilité [2]. Parmi les IST bactériennes, les plus représentées sont d'abord l'infection par *Chlamydia trachomatis*, puis l'infection par *Mycoplasma genitalium*, la gonorrhée (due à *Neisseria gonorrhoeae*) et enfin la syphilis (due à *Treponema pallidum*). Le traitement de ces infections est basé sur l'utilisation d'antibiotiques et le meilleur moyen de prévention reste à ce jour l'utilisation du préservatif.

M. genitalium est un micro-organisme bactérien et, tout comme *C. trachomatis*, est à l'origine d'urétrite non gonococcique (UNG) chez l'Homme. Ces deux agents bactériens sont d'ailleurs les plus fréquemment retrouvés lors d'UNG [3]. La prévalence de *M. genitalium* dans la population générale est estimée entre 1 et 3% mais peut monter jusqu'à 38% dans les populations à risque d'IST [4], [5]. Les populations à risque d'IST comprennent [6] :

- Les sujets masculins ayant des relations sexuelles avec d'autres sujets masculins en particulier si les relations sexuelles sont de type multipartenaires.
- Les sujets séropositifs.
- Les sujets ayant contractés plusieurs IST dans leurs vies.
- Les sujets pratiquant des relations sexuelles sans préservatif.
- Les sujets issus d'une zone géographique fortement touchée.
- Les usagers de drogue par voie intraveineuse.

M. genitalium est une bactérie donc le traitement d'une infection par *M. genitalium* nécessite l'utilisation d'antibiotiques. Les deux classes d'antibiotiques les plus utilisées sont les macrolides (et apparentés) ainsi que les fluoroquinolones. Malheureusement, une forte résistance aux macrolides s'est développée ces dernières années suite à leur utilisation abusive obligeant l'utilisation des fluoroquinolones qui est la deuxième ligne de traitement face à une infection à *M. genitalium* résistante aux macrolides. De la même façon, l'utilisation des fluoroquinolones a abouti à l'émergence d'une résistance à cette classe antibiotique.

L'objectif de mon travail a été de déterminer la prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez *M. genitalium* en France d'Outre-Mer en 2018. Cette étude a été menée sur des échantillons positifs à *M. genitalium* provenant de différents centres d'analyses et d'hôpitaux ultra-marins. Ces échantillons ont été envoyés au Centre de référence (CNR) des IST de Bordeaux entre le 1^{er} août et le 31 octobre 2018. La détermination de ces prévalences dans les DROM n'avait jamais été réalisée auparavant. Les prévalences obtenues seront comparées avec celles obtenues par le CNR des IST de Bordeaux la même année en France métropolitaine.

Etude bibliographique sur *Mycoplasma genitalium*

I. Caractéristiques générales

L'arbre phylogénétique de *M. genitalium* indique qu'il fait partie du règne des Eubactéries (classification établie à partir de la séquence de l'ARNr 16S) et de la classe des Mollicutes (figure 1) [7], [8]. La classe des Mollicutes regroupe des bactéries de petite taille et étymologiquement parlant, « Mollicutes » vient du latin « mollis » et « cutis » qui signifient « mou » et « peau » respectivement. De par leur étymologie, il est aisé de retenir que les Mollicutes ne possèdent pas de paroi [9]. Le genre le plus connu des Mollicutes est *Mycoplasma* mais on y retrouve aussi le genre *Ureaplasma*. Ces deux genres regroupent certaines bactéries pathogènes pour l'Homme surtout au niveau des voies respiratoire et urogénitale. Le genre *Mycoplasma* regroupe plus de 100 espèces. Certaines peuvent être des espèces parasites et d'autres peuvent faire partie de la flore commensale en fonction de l'hôte qui les héberge. Parmi les espèces présentes dans les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*, cinq espèces sont principalement retrouvées en clinique, *Mycoplasma pneumoniae*, *M. genitalium*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma* spp., (sous-divisée en deux espèces distinctes, *Ureaplasma parvum* et *Ureaplasma urealyticum*).

Selon leur site primaire d'isolement, ces mycoplasmes peuvent être séparés en espèces d'origine respiratoire et génitale :

- *M. pneumoniae*, d'origine respiratoire, n'appartient pas à la flore commensale. Il colonise les voies respiratoires haute et basse et possède un pouvoir pathogène certain.
- *M. genitalium*, *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. sont d'origine génitale. *Ureaplasma* spp., et moins communément *M. hominis*, peuvent être présents à l'état commensal au niveau du tractus urogénital. Néanmoins, ils sont associés à une grande variété d'infections urogénitales chez l'adulte et à des infections néonatales.

La plupart de ces espèces sont extracellulaires mais certaines, dont *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, sont capables de pénétrer dans les cellules [10].

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes procaryotes capables de réplication autonome. Ils sont ubiquitaires, retrouvés chez l'homme, les insectes et les plantes. Leur taille varie de 300 à 850 nm et ils possèdent les plus petits génomes bactériens (580 - 2 200 kb) [10], [11].

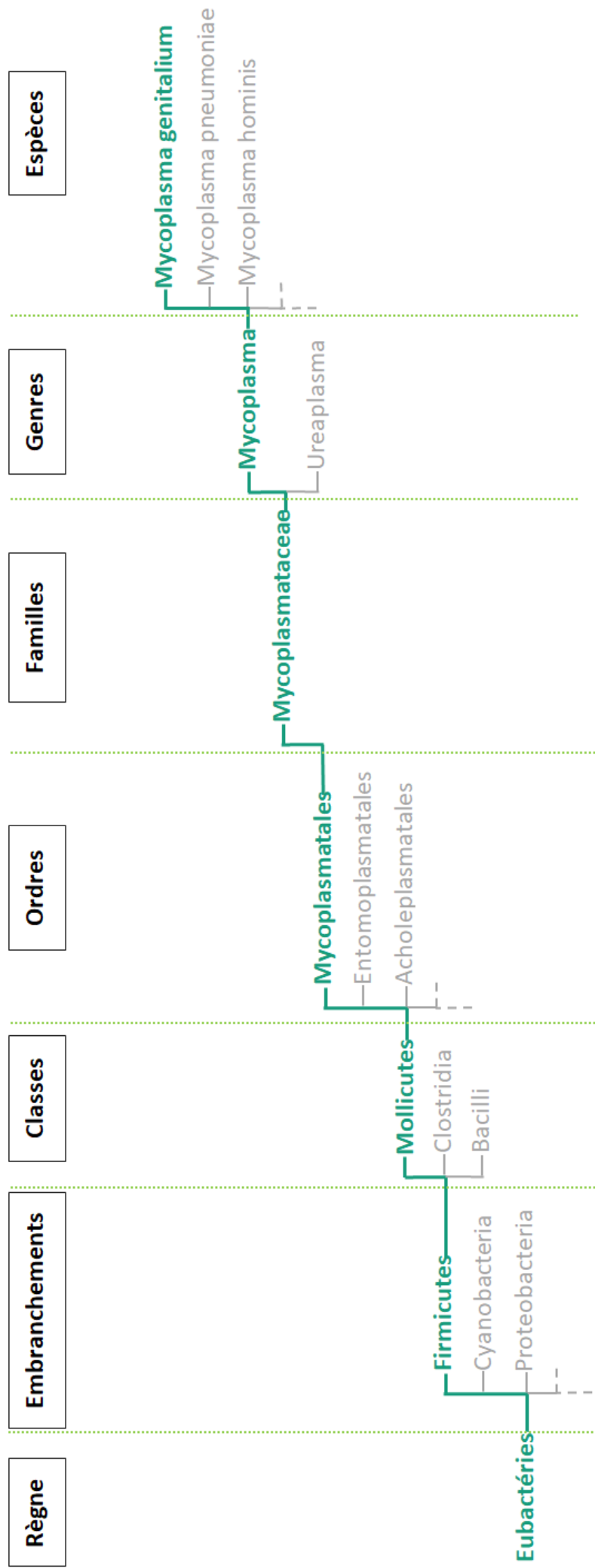


Figure 1: Classification de *M. genitalium*

M. genitalium dispose d'un organe au niveau de l'extrémité terminale appelé organelle d'attachement lui permettant ainsi d'adhérer aux cellules épithéliales du tractus génital. Ce mycoplasme peut également adhérer aux hématies et aux spermatozoïdes et va alors affecter leurs mobilités (figure 2). Cet organelle est composé de plusieurs cytoadhésines et de protéines accessoires (la principale cytoadhésine étant la protéine MgPa codée par le gène *mgpB*) [10], [12], [13]. Un total de 4,7% du génome de *M. genitalium* est attribuable à l'opéron *mgpB/mgpC* et la région des gènes *mgpB/mgpC* est hypervariable ce qui permet à *M. genitalium* d'échapper plus facilement au système immunitaire [13]. Cette stratégie d'évasion est potentiellement associée au passage à la chronicité d'une infection à *M. genitalium*. La chronicité est définie comme la persistance ou la récurrence des symptômes 30 à 90 jours après la mise en place d'un traitement [14].



Figure 2: Observation au microscope électronique de *M. genitalium*

M. genitalium ne possède pas de paroi et nous verrons par la suite que cette absence de paroi a un rôle dans sa résistance naturelle à certaines familles d'antibiotiques [15], [16].

Les mycoplasmes sont très difficiles à cultiver même sur les meilleurs milieux de culture du fait de la rareté des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse. C'est le cas de *M. genitalium* et *M. pneumoniae* qui ne possèdent pas les gènes nécessaires à la synthèse des acides aminés. Cela fait d'eux des organismes totalement dépendants d'un apport extérieur en acides aminés [11], [13], [17].

En effet, durant l'évolution des espèces, *M. genitalium* et *M. pneumoniae* ont perdu la totalité des gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés. Il est donc primordial que la cellule hôte ou que le milieu de culture soient capables de fournir les acides aminés essentiels nécessaires à leur croissance. *M. genitalium* est néanmoins capable d'utiliser du glucose en tant que substrat pour fournir de l'ATP.

M. genitalium et *M. pneumoniae* ont aussi perdu la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des cofacteurs. Pour les cultiver in vitro, il est donc important que les milieux de culture soient riches en vitamines [11]. La dernière perte notoire chez ces micro-organismes est celle de la paroi cellulaire. Cette absence de paroi rend les mycoplasmes osmotiquement plus sensibles que les bactéries qui en possèdent une. Le fait de ne pas posséder de paroi cellulaire allège le génome de *M. genitalium*. Ceci est démontré par la comparaison entre *Haemophilus influenzae* et *M. genitalium* :

- *H. influenzae* possède 105 gènes impliqués dans la synthèse de l'enveloppe cellulaire qui comprend la membrane externe et la membrane cytoplasmique.
- *M. genitalium* ne possède que 30 gènes associés à la synthèse des protéines membranaires [11].

Le nombre restreint de gènes chez *M. genitalium* explique son mode de vie de type parasitaire et, de ce fait, a permis aux chercheurs d'étudier les gènes essentiels au développement d'une cellule minimale. Il faut aussi noter que les systèmes de réparation de l'ADN sont rares chez *M. genitalium* ce qui peut expliquer l'émergence de mutations au sein de son génome [12].

Historiquement, c'est en 1980 que les chercheurs réussissent à isoler *M. genitalium* [1], [18]–[20] bien qu'il se développe de manière lente (plusieurs semaines voire mois) et reste difficile à cultiver. Son identification par le biais de la méthode de la coloration de Gram est impossible au vue de son absence de paroi. Suite au succès de son isolement, *M. genitalium* fût le deuxième génome entièrement séquencé en 1995. Il fût alors défini comme étant le plus petit génome connu avec environ 480 gènes soit 580 kilobases [11], [21], [22]. C'est en fragmentant aléatoirement l'ADN de *M. genitalium* en petits segments de 2kb que

son séquençage fût possible. Les segments de 2kb ont été clonés puis séquencés. Le chevauchement des différentes séquences a permis d'établir la séquence complète du génome de *M. genitalium* [11]. Le séquençage de *M. genitalium* a montré qu'il présentait au sein de son génome des séquences répétitives. Ces séquences lui permettent de pratiquer un réarrangement génomique faisant varier les antigènes se trouvant à sa surface. Cela permet certainement aussi à *M. genitalium* d'échapper au système immunitaire de l'hôte [11].

II. Physiopathologie de *M. genitalium*

M. genitalium étant localisé au niveau de l'appareil urogénital, sa transmission se produit lors de rapports sexuels de type génitaux/génitaux et de type génitaux/rectaux. Il est donc établi qu'un contact direct avec les muqueuses génitales et/ou rectales d'un sujet infecté est nécessaire à la transmission de *M. genitalium*. N'ayant pas de données concernant la durée d'incubation nécessaire pour que *M. genitalium* soit détectable, cette durée est évaluée à deux semaines par analogie au temps d'exposition nécessaire pour que *C. trachomatis* soit détectable.

Très souvent, la présence de *M. genitalium* et de *C. trachomatis* au sein d'un même patient est retrouvée. Il s'agit alors d'une co-infection ce qui est relativement fréquent chez les sujets à risque de développer une ou des IST. Il a été également identifié que, lors d'une infection par *M. genitalium*, la charge bactérienne de ce germe est 100 fois inférieure à celle de *C. trachomatis*.

Il existe une corrélation entre la présence de *M. genitalium* et l'infection par le VIH puisqu'il a été établi que l'infection à *M. genitalium* augmente le risque d'acquisition et de transmission du VIH [14]. Effectivement, l'adhérence de *M. genitalium* sur les cellules infectées par le VIH pourrait déclencher la libération du

virus par ces cellules [12]. Il est aussi suggéré que la réponse immunitaire innée induite par *M. genitalium* peut influencer la pathogenèse des autres IST dont le VIH. De plus, la clairance de *M. genitalium* chez un patient séropositif avec une faible charge de lymphocytes CD4 dans le sang sera beaucoup plus longue.

Il est reconnu que *M. genitalium* est une cause d'IST [9]. En effet, la prévalence de *M. genitalium* est significativement supérieure chez les partenaires des patients positifs à *M. genitalium* par rapport aux partenaires des patients négatifs présentant une urétrite ou une cervicite [10] puisque 63% des partenaires sexuels des patients positifs à *M. genitalium* sont infectés. De plus, la prévalence de l'infection à *M. genitalium* varie entre 4 et 38% dans les centres de dépistage des IST [14]. Le rôle de *M. genitalium* comme agent d'IST a également été démontré à l'échelon moléculaire. Chez des couples infectés, les échantillons positifs à *M. genitalium* présentaient les mêmes génotypes au niveau du gène *mgpB* ou avec d'autres marqueurs moléculaires. Dans ces cas, une concordance du génotype des souches cliniques représente un argument fort en faveur de cette voie de transmission [10].

La pathogenèse de *M. genitalium* résulte de plusieurs facteurs que sont [23]:

- Sa capacité d'adhésion aux cellules.
- Sa mobilité par glissement.
- Son invasion intracellulaire.
- Sa variation antigénique.

Chez un sujet féminin ayant été infecté par *M. genitalium*, celui-ci est retrouvé deux heures après l'infection accolé au vagin et au col de l'utérus. Trois heures après, il est retrouvé dans des vacuoles adjacentes à la membrane intracellulaire des cellules épithéliales génitales (figure 3) [24]. 24 à 48 heures après, *M. genitalium* est présent de manière plus significative au sein des cellules épithéliales du tractus urogénital que dans le milieu extracellulaire [24].

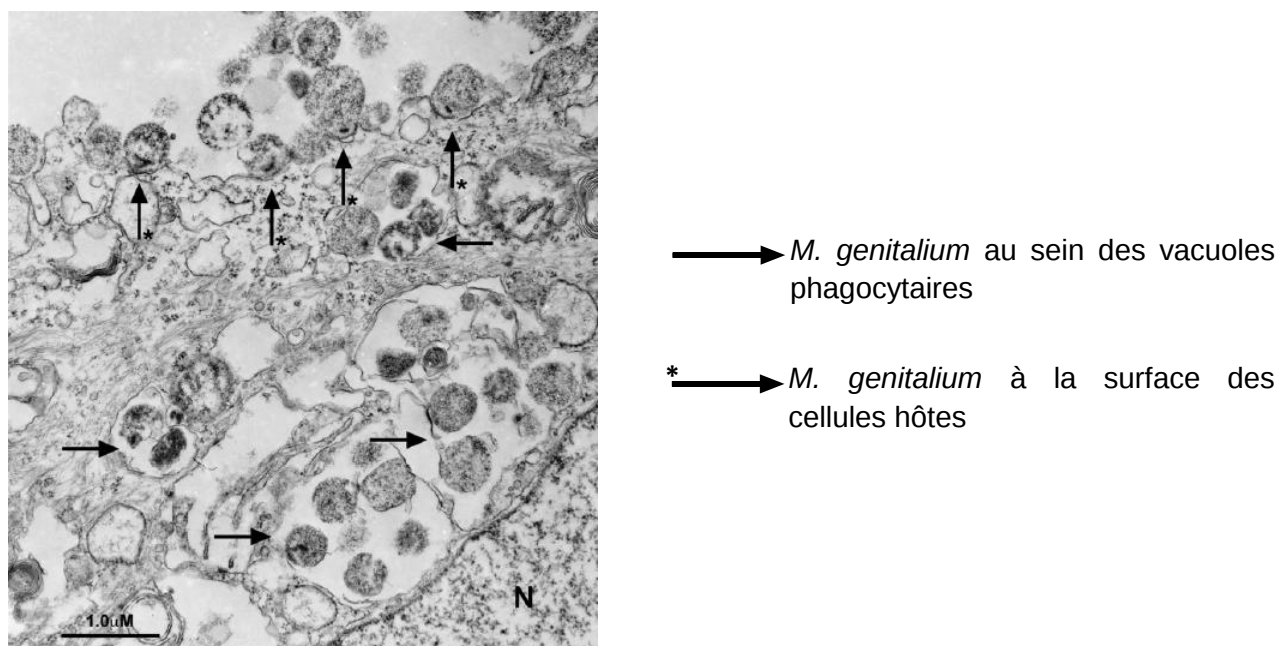


Figure 3: Observation au microscope électronique de la phagocytose de *M. genitalium* [23]

L'invasion de *M. genitalium* provoque une sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par les cellules infectées. Ces éléments pro-inflammatoires stimulent et recrutent les monocytes qui se différencient en macrophages. Les macrophages éliminent alors le pathogène par phagocytose. Pourtant, même si la phagocytose est un bon moyen d'élimination de *M. genitalium* par l'organisme infecté, la localisation intracellulaire de *M. genitalium* dans les cellules épithéliales génitales lui assure une protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte ainsi qu'une protection vis-à-vis des antibiotiques. Il s'agit d'une véritable niche de survie favorisant ainsi le passage de l'infection à la chronicité [24].

Pour déterminer la sensibilité de *M. genitalium* au phénomène de phagocytose par les macrophages, l'équipe du docteur McGowin a mis en contact des macrophages avec *M. genitalium*. 30 minutes après, la phagocytose s'est mise en place et un changement morphologique de *M. genitalium* a été observé. En effet, une perte de la densité des ribosomes ainsi qu'une apparence creuse ont été décrites ce qui signe la perte de viabilité de *M. genitalium* (figure 4a). Six heures après, les

macrophages ayant phagocyté les pathogènes sont remplis de vésicules phagocytaires mais aucun organisme intracellulaire n'est détecté (figure 4b).

La viabilité de *M. genitalium* après avoir été exposé aux macrophages a alors été évaluée en ensemençant les macrophages infectés dans un milieu de culture et aucune croissance n'a été détectée durant une période de 14 jours de culture. Les chercheurs en ont conclu que *M. genitalium* peut être éliminé par phagocytose.

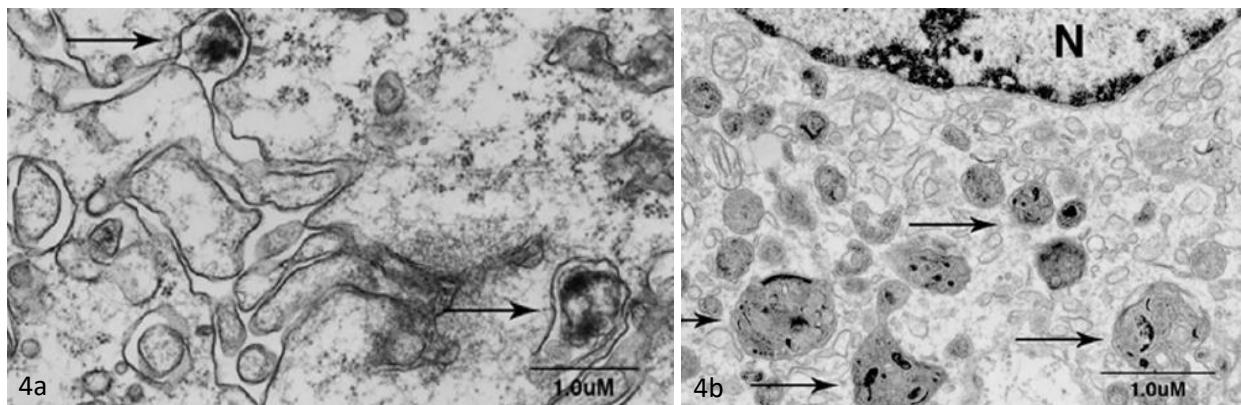


Figure 4: 4a Observation au microscope électronique du changement morphologique de *M. genitalium* [23]

4b Observation au microscope électronique de vésicules phagocytaires dénuées d'organismes intracellulaires [23]

L'infection par *M. genitalium* induit une réponse immunitaire innée notamment par l'intermédiaire des LAMP qui sont des lipoprotéines exprimées à la surface cellulaire des mycoplasmes. Ce sont les Récepteurs Toll Like (ou TLR) qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes et qui permettent de déclencher la réponse immunitaire innée lors de leurs liaisons avec les LAMP. Cette liaison avec *M. genitalium* active la voie NF- κ B [13], [14]. Ceci entraîne une sécrétion dose dépendante de TNF- α et d'IL-6 par les monocytes/macrophages [10].

III. Pouvoir pathogène

M. genitalium est détecté dans seulement 1 à 3,3% de la population générale [25]. L'infection à *M. genitalium* reste la plupart du temps asymptomatique ce qui pourrait expliquer en partie sa fréquence chez les patients touchés par des IST à répétition. En effet, une infection à *M. genitalium* est retrouvée chez 40% de ces patients. Dans le cas où l'infection à *M. genitalium* est symptomatique, il est tout d'abord constaté que la charge bactérienne est plus importante que chez un patient asymptomatique et que chez l'homme, dans 40 à 70% des cas, l'infection par *M. genitalium* est latente [26]. De plus, le tableau clinique des sujets de sexe féminin est différent de celui des sujets de sexe masculin.

Chez la femme, une infection par *M. genitalium* peut se traduire par une endométrite et une salpingite qui sont des infections génitales hautes ainsi qu'une cervicite (tableau 1). *M. genitalium* est d'ailleurs le seul mycoplasme à l'origine de cervicites.

Les principaux symptômes sont :

- Des douleurs pelviennes.
- Des écoulements vaginaux.
- Des saignements vaginaux si des rapports sexuels ont eu lieu durant l'infection ou des saignements inter-menstruels.

Chez l'homme, le tableau clinique d'une infection par *M. genitalium* est différent et peut se traduire par une urétrite, une épididymite avec des œdèmes testiculaires et rarement une arthrite réactionnelle (tableau 1). Un lien reste encore à être déterminé entre l'apparition d'une prostatite ou d'une rectite et une infection par *M. genitalium* [26].

Les principaux symptômes sont :

- L'inflammation de l'urètre, du gland ainsi que des testicules. L'urétrite peut être également à l'origine de prurit urétral.
- Les brûlures au cours de la miction.
- Les écoulements purulents et plus ou moins épais.

Si ces symptômes ne sont pas pris en charge et traités correctement, des complications peuvent apparaître. Dans le cadre où une patiente est enceinte, un lien entre une fausse couche ou un accouchement prématuré ou encore le décès du fœtus et l'infection par *M. genitalium* peut être suggéré mais les études à ce sujet sont à confirmer d'où la nécessité de rester prudent et de n'y voir que des suggestions de liens de causalité [14].

Tableau 1: Pathologies, symptômes et complications associés à une infection par *M. genitalium*

	Hommes	Femmes
Pathologies	Epididymite, arthrite	Cervicite, endométrite, salpingite
Symptômes	Urétrite, brûlures mictionnelles, écoulements	Inflammation du pelvis, saignements, écoulements
Complications		Possibles liens avec infertilité, fausse couche, accouchement prématuré, mort fœtale

De plus, il a été mis en évidence que la présence de *M. genitalium* est fortement associée à une UNG puisque *M. genitalium* représente jusqu'à 25% des cas d'UNG [27]. En effet, *M. genitalium* est présent chez 60% des hommes homosexuels et chez 20% des hommes hétérosexuels souffrant d'une UNG persistante ou récurrente [28]. La détection de *M. genitalium* est significativement plus importante chez les patients présentant une UNG que chez ceux qui n'en présentent pas [29].

IV. Diagnostic biologique

a) Prélèvements à effectuer

L'infection par *M. genitalium* étant localisée au niveau de l'appareil urogénital, les prélèvements nécessaires à son identification sont les urines du premier jet ou les prélèvements réalisés à l'aide d'un écouvillon : vulvaires, vaginaux, du col de l'utérus ou rectaux [9], [10]. Concernant les échantillons rectaux, ils sont plus souvent utilisés chez les HSH et se sont montrés très utiles puisqu'ils permettent de détecter jusqu'à 70% des infections par *M. genitalium* qui seraient non diagnostiquées sans ce site d'échantillonnage.

b) Culture

M. genitalium et *M. pneumoniae* ont de grandes exigences au niveau de l'apport nutritif nécessaire lors de leur culture. L'utilisation de milieux complexes pour leur culture est donc nécessaire. Ces milieux complexes sont constitués d'une infusion de cœur de bœuf, de peptone, d'extraits de levure et de sérum avec différents suppléments [11]. Leur culture étant assez complexe et pas forcément productive, une nouvelle approche a été développée pour les bactéries exigeantes comme *M. genitalium* : la coculture. Cette technique utilise une autre lignée cellulaire qui vient en aide à la croissance de la bactérie dite exigeante. Pour la croissance de *M. genitalium*, ce sont les cellules Vero, issues des cellules épithéliales de rein d'une espèce de singe appelée *Chlorocebus*, qui sont employées.

Cette coculture peut ensuite permettre aux mycoplasmes cultivés dans ces conditions de se répliquer dans un milieu sans cellule [11]. Malheureusement, cette technique est inadéquate pour la culture de routine. Le diagnostic de *M. genitalium*

est donc exclusivement réalisé par biologie moléculaire avec comme méthode de référence la PCR.

c) Détection par PCR

Les postulats de Henlé-Koch recensent les différents critères qui permettent d'établir un lien de cause à effet entre un agent pathogène et une maladie. Ces postulats ont été établis à l'origine pour définir l'étiologie de la tuberculose. Mais ces postulats paraissent insuffisants pour établir un lien de cause à effet entre *M. genitalium* et les urétrites/cervicites car ces symptômes ont différentes étiologies [30]. C'est la raison pour laquelle Taylor Robinson a procédé en la modification des postulats de Henlé-Koch pour *M. genitalium*.

Tout d'abord, la technique d'isolement du germe avait été basée sur un changement de couleur du bouillon de culture comme seule preuve témoignant de la croissance de *M. genitalium* mais ce fût un échec dû au manque de spécificité du protocole. En effet, ce changement de couleur était imputable à la présence d'autres bactéries.

De part ces difficultés de culture, ce n'est que dix ans plus tard et avec l'évolution des technologies (notamment le développement de la PCR ciblant *M. genitalium*) que les premières études cliniques sur *M. genitalium* ont pu être réalisées. Grâce à la technique de la PCR, le génome de *M. genitalium* a été amplifié et détecté permettant ainsi son identification et son diagnostic [1]. Cette PCR est réalisable à partir des différents prélèvements vus précédemment.

C'est en 1993 que les premières études cliniques sur *M. genitalium* ont lieu avec la technique de PCR [29]. Elles ont été menées sur 99 patients de sexe masculin fréquentant une clinique spécialisée dans le traitement des IST. Les études se portaient sur des prélèvements urétraux, rectaux et de gorge. La présence de l'ADN de *M. genitalium* a été notée chez 17% des prélèvements urétraux alors que

l'ADN du pathogène était absent dans les autres types de prélèvements. Cela a permis de conclure que le site principal d'infection de *M. genitalium* est le tractus urogénital [30].

Il est important de noter que la congélation des échantillons et des extraits d'ADN avant analyse peut diminuer la sensibilité de la méthode moléculaire. Twin *et al.* [31] mettent en évidence une dégradation significative de l'ADN dans les échantillons dès trois cycles de congélation/décongélation ou lors d'une congélation prolongée à -30°C. De plus, Carlsen *et al.* [32] montrent qu'après une deuxième extraction à partir d'échantillons cliniques congelés, la sensibilité de la méthode moléculaire est abaissée à 90 %. Dans ces mêmes conditions, la diminution de la quantité d'ADN est dix fois plus prononcée que pour les analyses effectuées à partir des extraits primaires d'ADN congelés. Une faible quantité initiale d'ADN dans les échantillons est un facteur aggravant pour la bonne détection de *M. genitalium*.

Plusieurs techniques ont été développées afin de détecter la présence de *M. genitalium* et/ou de mettre en évidence les mutations à l'origine de la résistance aux macrolides. Ces différentes techniques n'utilisent pas forcément les mêmes régions cibles de *M. genitalium* pour le mettre en évidence. En effet, certaines PCR ont pour cible l'ARNr 16S pour détecter *M. genitalium* or, il existe une forte homologie avec la séquence de l'ARNr 16S de *M. pneumoniae*. C'est pour cela que Jensen *et al.* ont choisi des amorces qui n'amplifient que *M. genitalium* puisque la fixation des amorces a lieu sur des régions présentant le moins d'homologie [18].

Contrairement à Jensen *et al.*, Muvunyi *et al.* ont utilisé comme gène cible *mgbB* afin de détecter *M. genitalium* [33]. Ils ont utilisé la PCR multiplex ou test STD Finder permettant de détecter sept IST à la fois (*Neisseria gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *C. trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* et l'herpès simplex virus de type 1 et 2). L'avantage de cette technique c'est qu'elle est capable de mettre en évidence plusieurs pathogènes en même temps mais elle reste assez complexe car des interactions non spécifiques entre les différentes amorces et sondes peuvent avoir lieu.

Muvunyi *et al.* ont obtenu de très bons résultats quant à la sensibilité et la spécificité de cette méthode pour *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *C. trachomatis*. En effet, celles-ci s'élevaient à 100%. Ces résultats ont été confirmés pour chaque pathogène par une PCR en temps réel utilisant des cibles spécifiques des différents pathogènes. Les résultats étaient les mêmes pour *M. genitalium* que ce soit avec la PCR en temps réel ou la PCR multiplex. Cette technique apporte un réel progrès pour la détection des IST puisque généralement, un patient atteint d'une IST présente une co-infection. Or, la PCR multiplex n'a besoin que d'un seul échantillon pour détecter plusieurs agents pathogènes à l'origine d'IST.

De plus, elle présente une forte sensibilité même si le ou les pathogènes sont en faible quantité (la limite de détection est à moins de 20 copies par échantillon pour la plupart des sept agents) ainsi qu'une forte spécificité pour identifier avec certitude le ou les pathogènes présents dans l'échantillon testé [33].

d) PCR de détection de la résistance

Il a été démontré que des mutations ponctuelles au niveau de certains gènes du domaine V de l'ARNr 23S étaient liées à une résistance de *M. genitalium* pour les macrolides. Entre 2011 et 2012, Touati *et al.* ont employé la PCR en temps réel de type FRET ainsi que l'analyse des courbes de fusion pour détecter ces mutations [34] (figure 5). La PCR en temps réel de type FRET est capable de distinguer la souche sauvage G37 des souches mutées ce qui raccourcit considérablement les délais d'initiation de traitement.

Leur étude a porté sur 202 échantillons prélevés chez 178 patients porteurs de *M. genitalium*. La présence de *M. genitalium* au sein de ces 202 échantillons a été validée par une PCR TaqMan ciblant le gène codant pour la protéine MgPa. Sur ces 202 échantillons, 155 furent amplifiés à l'aide de la PCR en temps réel de type FRET ce qui représente une sensibilité de 76,7%. En revanche, la spécificité est meilleure puisqu'aucune autre bactérie impliquée dans le développement d'infection urogénitale n'a été amplifiée. Parmi les 155 échantillons amplifiés (134 patients), une

mutation a été détectée chez 23 échantillons (19 patients). La présence de ces mutations a été confirmée par séquençage et la plupart des mutations étaient dues au remplacement de l'adénine par la guanine aux positions 2058 et 2059 (numérotation d'*Escherichia coli*) [34].

Il est à noter que la mutation A2059G était la plus représentée puisqu'au sein de ces 23 échantillons :

- 11 échantillons contenaient la mutation A2059G,
- 8 échantillons contenaient la mutation A2058G,
- 4 échantillons contenaient à la fois la mutation A2059G et A2058G.

Donc Touati *et al.* en ont conclu qu'entre 2011 et 2012, sur les échantillons des 134 patients amplifiés par la PCR en temps réel de type FRET, 19 contenaient une ou des souche(s) mutée(s) ce qui implique une résistance aux macrolides de 14,2 % [34].

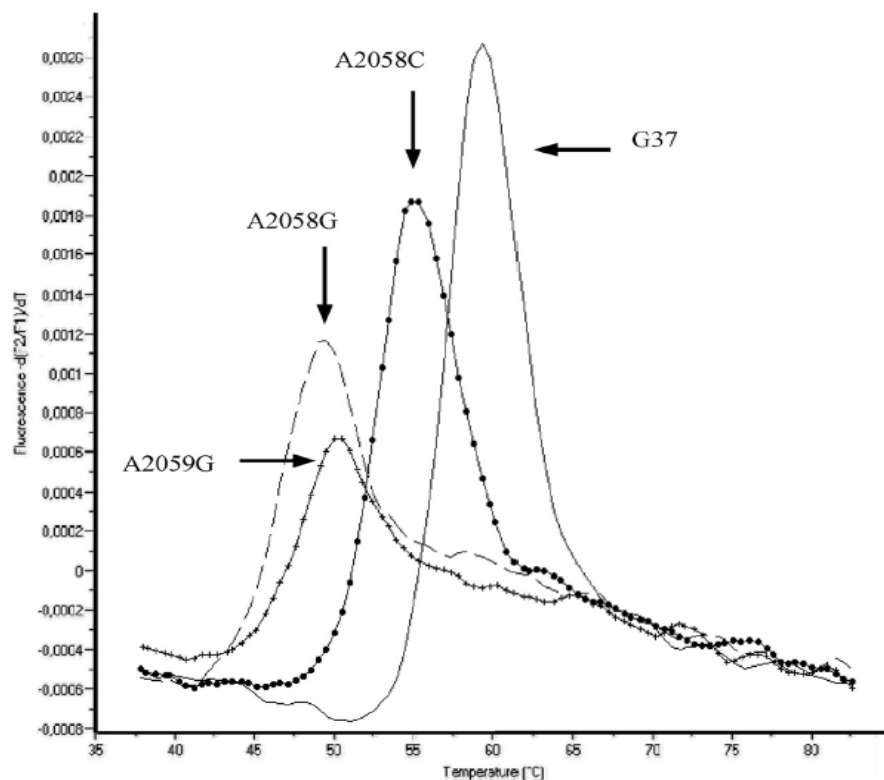


Figure 5 : Courbes de fusion obtenues après réalisation de la PCR de type FRET sur les souches mutées de *M. genitalium* et la souche sauvage G37, [26]

Une autre technique innovante est employée par Tabrizi *et al.* Il s'agit d'un test multiplex appelé SpeedX PlexZyme et PlexPrime permettant d'une part, de détecter *M. genitalium* en ciblant la protéine MgPa et d'autre part, de mettre en évidence cinq mutations associées à la résistance aux macrolides [19].

Ce test utilise un Primer (amorce classique) et un PlexPrimer qui se fixent sur la séquence cible à amplifier. Le PlexPrimer se compose de 3 parties:

- une extrémité 5T,
- une séquence appelée "insert" se situant entre les deux extrémités,
- une extrémité 3T contenant au niveau de sa séquence la mutation cible.

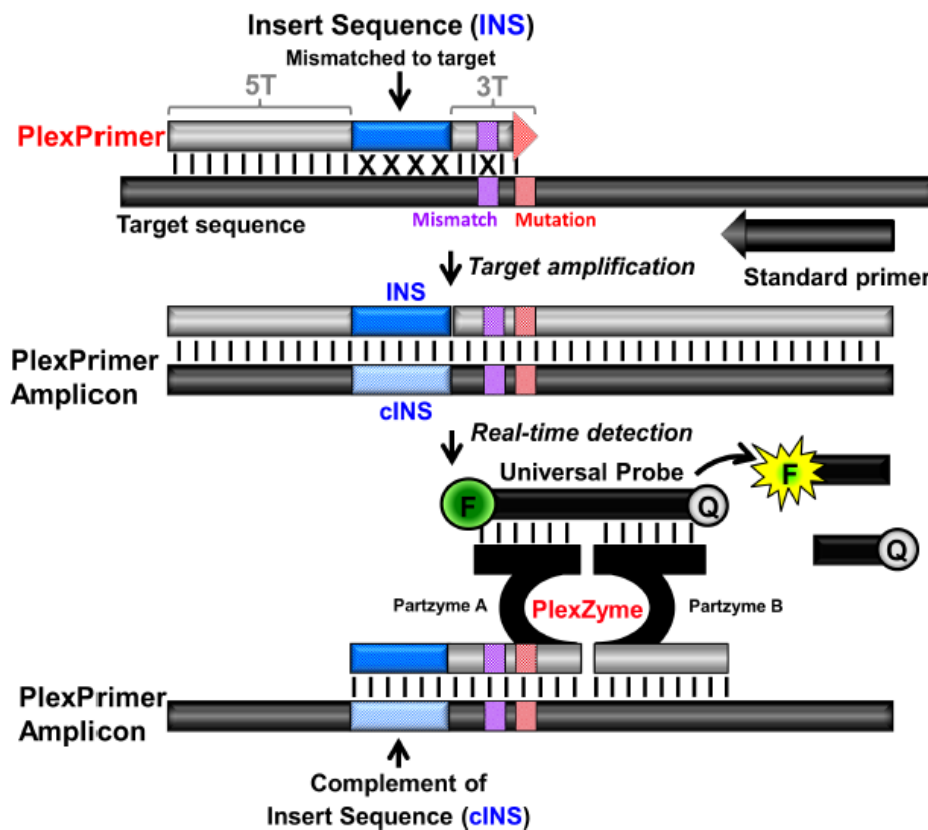


Figure 6 : Test multiplex SpeedX, [19]

Ce PlexPrimer a pour particularité de ne se fixer qu'en partie sur la séquence cible. En effet, seule l'extrémité 5T est strictement complémentaire de la séquence cible et la fixation de ce PlexPrimer ne se fera qu'à la condition que la séquence cible contienne la mutation cible. Cela permet de n'amplifier que les séquences contenant

la mutation recherchée. A l'issue de l'amplification, l'amplicon PlexPrimer est reconnu par un complexe nommé PlexZyme. Celui-ci est composé des partzymes A et B. Chaque partzyme comporte un noyau catalytique partiel, un bras de fixation à l'amplicon cible et un bras de fixation à une « sonde FQ ».

Cette sonde est composée d'un fluorophore F qui, en présence de l'inhibiteur Q, n'émet aucune fluorescence. Lorsque les deux partzymes sont fixées à l'amplicon, le noyau catalytique ainsi formé peut exécuter sa fonction de catalyseur. Cela provoque la section de la « sonde FQ » et donc la séparation de F et de Q. On a alors émission d'une fluorescence signalant la présence de la mutation cible.

Comme vu précédemment, il est compliqué de rechercher plusieurs mutations en même temps puisqu'une seule base varie dans la composition des amorces. Néanmoins, la nouvelle conception du PlexPrimer permet justement de surmonter cette limite en incorporant une séquence particulière pour une mutation donnée dans l'amplicon.

Pour résumer, la PCR en temps réel permet la détection qualitative et quantitative de *M. genitalium*. Les avantages de cette PCR sont également la facilité d'utilisation, l'augmentation de la sensibilité et de la spécificité et l'absence de manipulation post-amplification.

Ces quelques études [18], [19], [33], [34] ont évalué les sensibilités et spécificités relatives des différentes méthodes pour la détection de *M. genitalium*. Ces dernières diffèrent principalement dans leur séquence d'ADN cible, dans les techniques de préparation de l'échantillon, dans les méthodes d'amplification d'acides nucléiques et dans l'utilisation de double contrôle pour vérifier la présence du germe.

V. Antibiotiques actifs et résistances acquises

a) Antibiotiques actifs

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections par *M. genitalium*. Les deux principales familles utilisées sont les macrolides et les fluoroquinolones. On peut également citer les tétracyclines avec la doxycycline et une sous-famille des macrolides (et apparentés) que sont les streptogramines.

Historiquement, ce sont tout d'abord les tétracyclines qui ont été utilisées pour traiter une infection par *M. genitalium* mais leur efficacité était limitée avec seulement 30% de réussite [35].

Chaque famille d'antibiotique possède un mécanisme d'action qui lui est propre. C'est en détaillant leurs différents mécanismes d'action que nous pouvons comprendre les mécanismes de résistance développés par *M. genitalium* qui empêchent le bon fonctionnement du traitement par antibiotiques.

➤ Macrolides et apparentés

Parmi les macrolides et apparentés, l'antibiotique le plus utilisé est l'azithromycine et c'est d'ailleurs cette molécule qui est employée en traitement de première intention d'une infection par *M. genitalium*. Leurs mécanismes d'action consistent à bloquer la traduction de l'ARN messager en protéines bactériennes et donc d'empêcher la synthèse protéique. Les macrolides sont capables de se fixer sur la sous-unité ribosomique 50S qui ne peut plus fonctionner correctement car cette fixation provoque un encombrement stérique. Rappelons que la sous-unité ribosomique 50S faisant partie du ribosome des Procaryotes est elle-même composée de protéines ribosomiques et de deux ARN ribosomiques à savoir l'ARNr 23S et l'ARNr 5S.

La pristinamycine fait partie d'une des sous-classes des macrolides (et apparentés) appelée les streptogramines. La pristinamycine est composée de deux molécules, les pristinamycines IA et IIA qui ont un potentiel synergique puisque combinées, elles ont une action bactéricide. Cette synergie s'explique par la liaison de la pristinamycine IIA à la sous-unité ribosomique 50S ce qui induit un changement de conformation du ribosome afin d'améliorer la fixation de la pristinamycine IA. Cette dernière bloque alors de manière irréversible la synthèse protéique.

La pristinamycine peut être employée en cas d'une double résistance connue ou suspectée vis-à-vis des macrolides et des fluoroquinolones ou encore si les fluoroquinolones sont contre-indiquées. D'ailleurs, une étude publiée sur 114 patients australiens infectés par *M. genitalium* montre une guérison dans 75% des cas lors de la prise de quatre doses de 1g de pristinamycine durant dix jours [16]. Ces patients avaient été préalablement traités par de l'azithromycine mais le traitement a échoué. Celui-ci a été ou non relayé par de la moxifloxacine et s'est avéré être un échec. Cette molécule est donc utilisée sur les souches multirésistantes cependant, elle n'est pas utilisée en deuxième intention car il existe un réel manque d'études cliniques à son sujet et les posologies sont contraignantes (quatre prises de 1g par jour) ce qui pourrait engendrer un risque d'inobservance et donc d'échec du traitement [12].

➤ Fluoroquinolones

La famille des fluoroquinolones agit, elle, différemment. Ses cibles sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. L'ADN gyrase et la topoisomérase IV sont des topoisomérases de type II c'est-à-dire qu'elles sont capables de réaliser une coupure double-brin de l'ADN. C'est au cours de la réplication de l'ADN que cette cassure entre en jeu. Effectivement, elle facilite l'action de l'ADN polymérase afin de synthétiser un nouveau brin d'ADN. Or, les fluoroquinolones inhibent les topoisomérases de type II et se fixent à l'ADN entraînant la formation d'un complexe FQ-ADN irréversible. Les topoisomérases ne peuvent donc plus agir et les coupures double-brin de l'ADN restent permanentes.

La molécule utilisée parmi les fluoroquinolones est la moxifloxacin (fluoroquinolone de quatrième génération) car *M. genitalium* est naturellement résistant aux anciennes générations de fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine et la lévofloxacine [36]. L'usage des fluoroquinolones fait tout de même l'objet d'un certain nombre d'avertissements ainsi que de restrictions d'indications en Europe et aux Etats-Unis au vue de leur hépatotoxicité, du risque d'arythmie et d'apparition de tendinites.

➤ Tétracyclines

Le mécanisme d'action des tétracyclines est similaire à celui de la famille des macrolides (et apparentés) puisqu'elles aussi bloquent la traduction de l'ARN messager en protéines bactériennes mais cette fois-ci, en se fixant sur la sous-unité ribosomique 30S qui est le centre de décodage de l'ARN messager. La formation de protéines est alors rendue impossible. C'est la doxycycline qui peut être employée en cas d'infection par *M. genitalium*.

➤ Autres possibilités de traitement en cours d'expérimentation

Bradshaw *et al.* ont publié un article abordant de nouveaux horizons de traitement de l'infection par *M. genitalium*. Ces nouveaux traitements seraient basés sur des agents ayant des cibles et/ou des mécanismes d'action différents de ceux des molécules actuellement disponibles. De par le fait que leurs actions et/ou cibles seraient différentes, ces nouveaux agents seraient moins susceptibles de présenter une résistance croisée avec les médicaments déjà utilisés ce qui est plutôt prometteur au vue de l'accroissement de la résistance aux traitements actuels.

Seulement deux de ces nouveaux agents seront évoqués.

La solithromycine est un antibiotique de la sous-classe des kétolides et plus précisément, c'est un fluorokétolide expérimental. Sa liaison se fait sur trois sites

ribosomiques au niveau des domaines II et V de l'ARNr 23S. Cet ancrage est plus solide et différent de celui de l'azithromycine. Ce qui est intéressant avec cette molécule c'est qu'elle atteint de forte concentration intracellulaire mais son hépatotoxicité pose question donc la solithromycine n'a pas reçu l'approbation de la FDA aux Etats-Unis. Néanmoins, son spectre d'action est plus large que les autres molécules et elle est active sur les souches sensibles et résistantes aux macrolides. Il existe cependant une résistance croisée car la mutation A2058G augmente la CMI de la solithromycine [12]. Il est nécessaire de pratiquer d'autres essais cliniques pour établir une véritable sécurité d'utilisation [16].

Le deuxième antibiotique est la léfamuline qui est une pleuromutiline expérimentale se fixant à la sous-unité ribosomique 50S et inhibe l'initiation de la traduction. La léfamuline a la même cible que les macrolides vrais mais son mécanisme d'action est différent ce qui engendre peu de résistance croisée. Actuellement, des essais cliniques sont en cours dans le traitement d'une pneumonie bactérienne suite à une infection par *M. pneumoniae*. Les résultats sont plutôt concluants puisque la léfamuline a une action bactéricide sur *M. pneumoniae* que ce soit une souche sensible ou une souche résistante aux macrolides ce qui représenterait un réel potentiel vis-à-vis d'une infection par *M. genitalium* en échec thérapeutique face à l'utilisation de macrolides [16].

b) *M. genitalium* naturellement résistants à certains antibiotiques

Les β -lactamines représentent la plus grande famille d'antibiotiques mais elle n'est malheureusement pas utilisée dans le traitement des infections à *M. genitalium* car elle agit sur la synthèse de la paroi bactérienne. Son action consiste en l'inhibition des transpeptidases à l'origine de la formation de la paroi bactérienne. Or, comme nous l'avons vu précédemment, *M. genitalium* ne possédant pas de paroi cellulaire, cette bactérie est donc naturellement résistante à toute la famille des β -lactamines ainsi qu'aux autres antibiotiques agissant comme inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne comme la fosfomycine et les glycopeptides [14].

c) Prévalence de la résistance et mécanismes de résistance

Cinq molécules font partie des stratégies thérapeutiques dans le traitement de l'infection par *M. genitalium* (voir les recommandations Européennes). Cependant, elles n'ont pas toutes le même taux de réussite. Par exemple, l'usage de l'azithromycine à 1,5g pendant 5 jours (soit 500mg le premier jour suivi de 250mg du deuxième au cinquième jour) permet un taux de guérison relativement satisfaisant puisqu'il se chiffre entre 85 et 95% sur une souche sensible alors que l'usage de la doxycycline n'aboutit qu'à un faible taux de guérison (30 à 40%) mais a pour point positif de ne pas participer à l'augmentation de la résistance antibiotique [25], [37].

Il sera pourtant compliqué de conserver un tel taux de guérison en utilisant l'azithromycine car on observe une augmentation rapide de la résistance aux macrolides et donc une forte diminution du taux de guérison global. En effet, l'efficacité d'un traitement employant 1g d'azithromycine en monodose n'est plus que de 70% tandis que la résistance aux macrolides croît. [19] C'est pour cette raison que ce traitement par monodose a été supprimé dans de nombreuses recommandations. Comme la résistance à cette famille d'antibiotiques est répandue en Europe, un test détectant la présence d'une mutation à l'origine de la résistance à la famille des macrolides doit être conduit si le dépistage de *M. genitalium* s'avère positif. Malgré tout, la détection de mutations à l'origine de la résistance à la famille des fluoroquinolones n'est pas systématique en Europe car le pourcentage de résistance est assez faible (<5%). Par contre, il serait intéressant de la pratiquer en Asie car la résistance à cette famille d'antibiotiques est plus élevée. En effet, l'échec du traitement par utilisation de fluoroquinolones s'élève jusqu'à 30%.

En fonction du pays, la molécule de deuxième intention n'est pas la même. Effectivement, en Europe, en cas d'échec à l'azithromycine, la molécule de deuxième intention est la moxifloxacin à 400mg une fois par jour pendant 10 jours alors qu'au Japon c'est la sitafloxacin à 100mg deux fois par jour pendant sept à 14 jours.

Bien que la sitafloxacin puisse être active sur certaines souches présentant une résistance à la moxifloxacin, une résistance à la sitafloxacin émerge depuis quelques années [36].

Donc une augmentation des résistances acquises aux premières lignes de traitement est observée à savoir les macrolides ainsi que les fluoroquinolones même si elle est moindre pour cette dernière classe d'antibiotiques. En effet, en Europe, la résistance aux fluoroquinolones est moins fréquente. C'est en 2011 à Londres que fût rapporté un premier cas de résistance aux fluoroquinolones [7]. Cette augmentation est préoccupante d'autant plus que les autres options thérapeutiques sont restreintes. En revanche, aucune mutation aboutissant à une résistance aux tétracyclines (doxycycline) n'a été démontrée chez *M. genitalium* [23]. Ce n'est cependant pas un antibiotique de premier choix pour traiter l'infection même si la CMI de la doxycycline est relativement faible, les résultats de guérison sont médiocres et se situent entre 22 et 45% [16].

➤ Prévalence de la résistance

Machalek *et al.* ont voulu déterminer la prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones en fonction du temps et de la situation géographique. Pour se faire, ils ont fait la synthèse de 57 études sur la résistance aux macrolides, 25 études sur la résistance aux fluoroquinolones et 22 études sur la résistance aux deux classes d'antibiotiques [9]. Les informations ont été collectées jusqu'au sept janvier 2019. Cette méta-analyse montre une évolution plutôt alarmante de la résistance aux macrolides au fil du temps et dans le monde. En effet, avant 2010, la prévalence moyenne des mutations associées à la résistance aux macrolides dans le monde était de 10% alors qu'entre 2016 et 2017, elle s'élevait à 51,4%. La Norvège, le Canada, les Etats-Unis et l'Australie sont les pays les plus touchés avec des prévalences supérieures à 50% (figure 7).

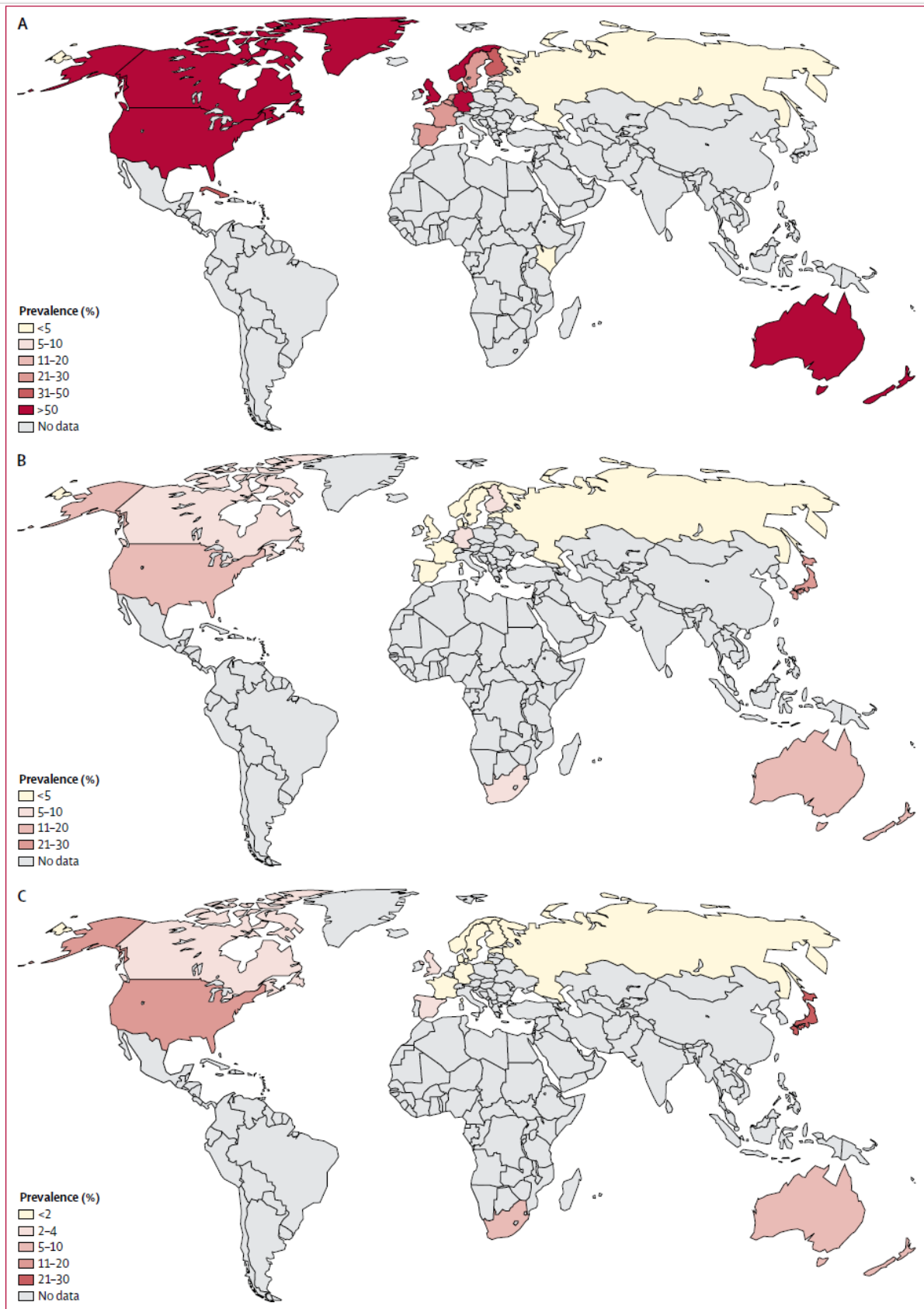


Figure 7: Planisphère de la prévalence en 2019 de la résistance aux macrolides (A), de la résistance aux fluoroquinolones (B) et de la résistance aux deux classes macrolides et fluoroquinolones chez *Mycoplasma genitalium* [9]

La faible prévalence de la résistance aux macrolides en Russie s'expliquerait par le fait que le traitement de première intention face à une UNG est différent de celui employé en France. En Russie, la doxycycline ou la josamycine sont les deux molécules utilisées en première intention face à une infection par *M. genitalium*. La josamycine étant un macrolide à courte demi-vie, le traitement s'étendra sur sept à dix jours.

En revanche, la prévalence des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones et celle des mutations associées à une résistance aux deux classes d'antibiotiques n'ont pas évolué de manière significative dans le monde et s'élèvent respectivement à 7,7% et à 2,8%. C'est en Amérique du Nord et en Australie que la résistance aux fluoroquinolones est la plus forte (figure 7).

Cette méta-analyse présente cependant plusieurs biais :

- Les échantillons provenaient de patients symptomatiques et/ou de patients à haut risque de développer une IST donc sont peu représentatifs de la population générale.
- Hétérogénéité des méthodes employées pour détecter *M. genitalium*.
- Les majorités des études émanent de l'Europe, de l'Australie et du Japon ce qui rend difficile l'extrapolation au monde entier.
- La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones est surestimée car dans la plupart des études, quatre mutations du gène *parC* étaient incluses alors que c'est la mutation Ser83Ile qui est la plus significative (voir mécanisme de résistance aux fluoroquinolones).

➤ Mécanisme de résistance aux macrolides

Concernant les mécanismes de résistance à la famille des macrolides, un changement de base est notoire aux positions 2058 et 2059 au niveau de la boucle centrale du domaine V de l'ARN ribosomique 23S (numérotation d'*E. coli*) donnant lieu aux mutations A2058G et A2059G qui sont les deux mutations prédominantes.

Or, nous avons vu précédemment que la grande sous unité 50S est composée entre autre de l'ARNr 23S. Si celle-ci est la cible des macrolides, une mutation au niveau du domaine V de l'ARNr 23S empêche le bon fonctionnement de cette classe antibiotique et entraîne par la suite une résistance aux macrolides (et apparentés). Effectivement, les mutations A2058G et A2059G peuvent entraîner en plus d'une résistance à l'azithromycine, une résistance à la josamycine. Une autre mutation dans l'ARNr 23S à la position 2062 (A2062G) est à l'origine d'une résistance de haut niveau à la josamycine mais pas à l'azithromycine. Par contre, il n'a pas été établi que ces deux mutations puissent coexister au sein du gène de l'ARNr 23S [12].

Une étude menée à Melbourne entre 2004 et 2005 a sélectionné neuf patients positifs à *M. genitalium* et huit d'entre eux étaient symptomatiques. Ces patients ont été sélectionnés car le traitement par 1g d'azithromycine avait échoué. Des échantillons ont été prélevés en prétraitement afin de connaître le statut mutationnel des souches avant la prise d'une monodose d'azithromycine à 1g [37]. Un des neuf échantillons possédait initialement la mutation A2058G. A l'issue du traitement par 1g d'azithromycine, sept des neuf échantillons avaient développé une mutation à l'origine de la résistance aux macrolides (trois mutations A2058G et quatre mutations A2059G). Cela laisse à penser qu'un traitement par azithromycine sélectionne les mutations responsables de la résistance aux macrolides. La méthode utilisée pour détecter la présence de mutations au sein du gène de l'ARNr 23S de *M. genitalium* est bien spécifique puisque sur 100 échantillons positifs pour *C. trachomatis*, aucune amplification n'a été observée avec la PCR détectant les mutations aux positions 2058 et 2059. Malgré l'échec du traitement par une monodose d'azithromycine, les huit patients symptomatiques (celui présentant initialement une mutation en fait partie), ont ressenti un soulagement des symptômes suite à l'administration d'azithromycine. Cette amélioration est attribuable aux propriétés immunomodulatrices de l'azithromycine.

L'augmentation de la résistance aux macrolides se justifie par une utilisation généralisée de l'azithromycine monodose depuis les années 90 pour le traitement des IST ainsi que l'absence de surveillance de la prévalence de *M. genitalium* et des marqueurs de résistance [9].

Bissessor *et al.* ont étudié une cohorte de 155 patients traités par 1g d'azithromycine entre juillet 2012 et juin 2013. Si un échec au traitement par azithromycine était spécifié, les patients étaient traités par 400mg de moxifloxacine pendant dix jours et si malgré ce deuxième traitement, celui-ci se révélait être de nouveau un échec, les patients seraient traités par 1g de pristnamycine quatre fois par jour pendant dix jours [38].

Sur les 155 patients positifs à *M. genitalium* et traités par 1g d'azithromycine 95 ont guéri (61,3%) et 60 patients (38,7%) se sont vus toujours positifs à l'issu de ce traitement. La guérison des patients est déclarée si le TOC (test post-traitement) est négatif 28 jours après le traitement par l'azithromycine. Parmi les 155 échantillons, 56 (36,1%) présentaient une mutation à l'origine de la résistance aux macrolides avant même la prise du traitement par 1g d'azithromycine.

Les 60 patients non guéris par l'azithromycine ont été alors traités par moxifloxacine : 53 patients (88,33%) ont été guéris et sur les sept patients (11,66%) qui ont connu un échec au traitement par moxifloxacine six présentaient en prétraitement des échantillons avec une mutation au niveau du gène *parC*. Ces sept patients ont été traités avec de la pristnamycine et six d'entre eux ont guéri (85,7%).

L'estimation du taux de sélection de mutants après un traitement antibiotique s'obtient en ne comptant que les patients qui développent une mutation suite à la prise de l'antibiotique et en excluant ceux qui possédaient déjà la mutation. Sur les 56 patients présentant une mutation A2058G ou A2059G en prétraitement, 49 n'ont pas répondu au traitement par l'azithromycine. Donc, en déduisant ces 49 patients aux 60 patients en échec au traitement par l'azithromycine, 11 patients présentaient une mutation entraînant une résistance aux macrolides suite au traitement par 1g d'azithromycine ce qui représente une sélection de mutants dans 18,33% des cas en échec [38].

Cette étude montre bien que le traitement d'une infection à *M. genitalium* par de l'azithromycine à 1g n'est plus vraiment indiquée puisque l'OMS décrète que pour qu'un antibiotique soit considéré comme étant efficace, le taux de guérison doit être supérieur à 95%.

Une étude plus récente a été menée à Melbourne entre juin 2016 et mai 2017 par Read *et al.* qui consiste à traiter les patients infectés par *M. genitalium* selon un protocole guidé par le statut mutationnel au niveau du gène de l'ARNr 23S [39]. Les patients sont donc traités initialement par doxycycline à raison de 100mg deux fois par jour pendant sept jours puis, une recherche de résistance aux macrolides est effectuée. Cette recherche de résistance permet d'orienter le clinicien et d'ainsi limiter le développement de résistance aux lignes de traitements existantes :

- Si la recherche de résistance aux macrolides est négative, cela signifie que la souche est sensible aux macrolides. L'utilisation de l'azithromycine est alors envisageable et ce, sur quatre jours avec le schéma suivant : 1g le premier jour puis 500mg les trois derniers jours.
- Si la recherche de résistance est positive, cela signifie que la souche est résistante aux macrolides. Ne pouvant pas utiliser l'azithromycine, c'est la sitafloxacin qui sera utilisée au dosage de 100mg deux fois par jour pendant sept jours.

L'étude s'est portée sur une sélection de 244 patients après avoir exclu ceux ayant des relations sexuelles sans préservatif et ceux ne se présentant pas pour effectuer le TOC. Sur les 244 patients inclus, 167 présentaient une résistance aux macrolides et ont donc été traités par sitafloxacin avec un taux de guérison de 92,2% (154 patients guéris). Les 77 patients restants ont été traités par de l'azithromycine avec un taux de guérison de 94,8% (73 patients guéris). Ce qui revient à un taux de guérison global de 93%, soit 227 patients guéris. Ce traitement présomptif avec de la doxycycline suivi d'un traitement guidé par la résistance aux macrolides permet une nette amélioration du taux de guérison par rapport aux traitements probabilistes [39].

Même si la doxycycline ne guérit qu'un tiers des infections par *M. genitalium*, elle ne sélectionne pas d'autres résistances et permet d'obtenir de meilleurs résultats. De plus, il est probable que la doxycycline diminue la charge bactérienne rendant *M. genitalium* plus sensible aux macrolides ultérieurement mais il est difficile de l'affirmer.

Des recherches supplémentaires doivent être menées afin de savoir si un traitement séquentiel comme Read *et al.* permet d'obtenir un meilleur taux de guérison qu'un traitement simultané. Néanmoins, ce traitement séquentiel est maintenant recommandé pour le traitement des infections à *M. genitalium* en Australie.

➤ Mécanisme de résistance aux fluoroquinolones

Il a été observé qu'un polymorphisme mononucléotidique au niveau de la QRDR, pour Quinolone Resistance Determining Region, des gènes *parC* et *gyrA* de *M. genitalium* serait à l'origine d'une mutation médiatrice de résistance aux fluoroquinolones. Rappelons que les gènes *parC* et *parE* font partie de la topoisomérase IV et que les gènes *gyrA* et *gyrB* font partie de l'ADN gyrase [40]. Or, ces deux topoisomérases de type II sont les cibles des fluoroquinolones donc une mutation au niveau de la fixation de ces antibiotiques peut mettre en péril leurs actions bactéricides. Cependant, les mutations au niveau du gène *gyrA* sont moins impliquées dans le développement de la résistance aux fluoroquinolones.

Il existe plusieurs polymorphismes mononucléotidiques au niveau de la QRDR du gène *parC* mais celui qui serait le plus à même d'engendrer une résistance aux fluoroquinolones c'est le changement de l'acide aminé sérine en position 83 par l'acide aminé isoleucine (Ser83Ile).

Hamasuna *et al.* ont étudié la relation entre les CMI des différentes fluoroquinolones et la présence de mutations dans le gène *parC* impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones. Pour ce faire, ils ont comparé les CMI de quatre fluoroquinolones obtenues suite à leurs expositions aux souches de patients infectés par *M. genitalium* et les CMI de quatre fluoroquinolones obtenues suite à l'exposition à la souche sauvage G37. Ils ont constaté que la mutation Ser83Ile provoque une élévation de la CMI pour les quatre fluoroquinolones testées qui sont la ciprofloxacine, la lévofloxacine, la moxifloxacine et la sitafloxacine [36]. Qui plus est, les CMI des différentes fluoroquinolones n'étaient pas impactées de la même manière en fonction de la mutation présente (tableau 2).

Dans ce tableau, toutes les mutations recensées au niveau du gène *parC* ne sont pas référencées. Seulement celles impliquant une augmentation de la CMI d'une ou plusieurs fluoroquinolone(s). Les mutations au niveau du gène *gyrA* ne sont pas non plus référencées.

Tableau 2: Variation des CMI des quatre fluoroquinolones en fonction des mutations rencontrées au niveau du gène *parC* de la topoisomérase IV de *M. genitalium*

	CMI ciprofloxac.	CMI lévofloxac.	CMI moxifloxac.	CMI sitafloxac.
WT (G37)	8	2	0,06	0,125
Ala66Thr	1	1	0,125	0,06
Asp84Tyr	4	4	0,5	0,125
Ser83Ile	≥16	Entre 8 et >16	Entre 2 et 16	Entre 0,25 et 1

Il est intéressant de noter que seulement la mutation Ser83Ile augmente les CMI des quatre fluoroquinolones. L'intérêt est surtout porté sur la moxifloxacine puisque c'est l'antibiotique de deuxième intention dans le traitement d'une infection par *M. genitalium* en France. Cette augmentation est constatée par la comparaison des valeurs de chaque CMI des quatre fluoroquinolones obtenue en présence des différentes souches porteuses de ces mutations aux CMI de ces mêmes antibiotiques en présence de la souche sauvage G37.

Tous les polymorphismes mononucléotidiques n'aboutissent pas à une augmentation de la CMI de la moxifloxacine et donc à une résistance aux

fluoroquinolones. Cependant, la présence de la mutation Ser83Ile est un bon marqueur dans l'évaluation de la résistance à la moxifloxaciné puisqu'elle est souvent présente lors d'un échec au traitement par moxifloxaciné [40].

De plus, les CMI des quatre fluoroquinolones peuvent paraître plus élevées lorsque les antibiotiques sont mis en contact avec une souche présentant la mutation Ser83Ile que par rapport aux souches présentant les deux autres mutations référencées dans le tableau 2 mais chaque souche présentant la mutation Ser83Ile était couplée d'une mutation au sein du gène *gyrA*. Donc il est probable que l'augmentation des CMI des antibiotiques testés se voit amplifiée par la présence d'une mutation au sein du gène *gyrA* et engendre une résistance aux fluoroquinolones. Par contre, une mutation seule au sein du gène *gyrA* ne semble pas beaucoup impacter la CMI des antibiotiques et donc la résistance aux fluoroquinolones [36].

Hamasuna *et al.* ont aussi procédé à un recueil d'échantillons chez des patients japonais pour évaluer l'évolution dans le temps de la résistance de *M. genitalium* aux fluoroquinolones [36]. Ce recueil s'est déroulé durant deux périodes :

- Entre 2005 et 2009, 84 échantillons ont été prélevés.
- Entre 2010 et 2017, 64 échantillons ont été prélevés.

Ils ont observé une nette augmentation de la prévalence des différentes mutations pouvant être présentes dans le gène *parC* durant ces 12 années. En effet, entre 2005 et 2009, 19 échantillons présentait une mutation dans le gène *parC* (22,6%) et entre 2010 et 2017, 34 échantillons présentait une mutation (53,1%) [36].

Ils sont allés plus loin dans leur étude et ont aussi cherché la présence de mutations responsables d'une résistance aux macrolides et d'autres responsables d'une résistance aux fluoroquinolones au sein d'un même échantillon :

- Entre 2005 et 2009, aucun échantillon ne présentait à la fois deux mutations potentiellement responsables des résistances aux deux classes d'antibiotiques citées précédemment.

- Entre 2010 et 2017, 16 échantillons (25%) présentait deux mutations potentiellement responsables d'une résistance à la fois aux macrolides et aux fluoroquinolones.

Plus précisément, la moitié des souches ayant les deux mutations présentait la mutation Ser83Ile au niveau du gène *parC* soit 12,5% des 64 échantillons prélevés entre 2010 et 2017.

Il est difficile d'affirmer que la souche présentant la mutation Ser83Ile entraînera obligatoirement une résistance aux fluoroquinolones puisque qu'Hamazuna *et al.* n'ont pas forcément constaté un échec thérapeutique lorsque cette mutation était présente. Ils en ont conclu que la présence de la mutation Ser83Ile est étroitement liée à une résistance à la moxifloxacine et donc à un échec thérapeutique. De plus, au Japon, lorsqu'un échec au traitement par l'azithromycine est observé, leur traitement de deuxième intention n'est pas l'utilisation de la moxifloxacine mais de la sitafloxacine. Or, d'après le tableau 2, la CMI de la sitafloxacine est la moins affectée par la présence de mutations au sein du gène *parC*. C'est pour cela que des guérisons ont lieu avec cet antibiotique.

En revanche, une résistance à la sitafloxacine peut être observée si la souche contient à la fois la mutation Ser83Ile et une mutation au niveau du gène *gyrA*.

L'une des premières souches multirésistantes décrite en Europe a été étudiée par Braam *et al.* Elle a été retrouvée chez un patient néerlandais de 47 ans souffrant d'urétrite et dont les tests de dépistage à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *T. vaginalis* se sont avérés négatifs [5]. Le traitement initial s'est alors porté sur une dose unique d'azithromycine à 1g mais ce fût un échec. S'en est suivie une batterie de traitements (cinq jours d'azithromycine à 1,5g, puis une dose journalière de 400mg de moxifloxacine pendant dix jours puis deux doses par jour de 100mg de doxycycline pendant sept jours et de nouveau une dose journalière de 400mg de moxifloxacine pendant 14 jours) qui ont tous échoués puisque le patient, malgré tous ces traitements, présentait toujours des brûlures mictionnelles et des écoulements urétraux.

Le dernier échantillon prélevé chez ce patient a été obtenu quatre semaines après la fin des traitements pour déterminer le statut de résistance des souches présentes dans ce prélèvement. Le séquençage des gènes *gyrA/gyrB*, *parC* et de l'ARNr 23S a mis en évidence la présence des mutations A2059G et Ser83Ile. Au vu des résultats, il est peu probable qu'il s'agisse d'une infection mixte par une souche résistante aux macrolides et d'une autre souche résistante aux fluoroquinolones puisque lors de la PCR, un seul pic a été observé et l'échantillon a été prélevé après prescription d'azithromycine et de moxifloxacin. Donc les deux mutations sont au sein de la même souche [5].

VI. Traitements et recommandations Européenne et Anglaise

a) Les recommandations Européennes de 2016

D'après les recommandations Européennes de 2016, une recherche de *M. genitalium* doit être faite chez les patients présentant des comportements sexuels à haut risque ainsi qu'en présence de symptômes [25]. Idéalement, les prélèvements doivent être faits avant l'initiation du traitement antibiotique et le traitement doit être débuté après le résultat du test de l'antibiorésistance.

Les laboratoires pratiquant le diagnostic de *M. genitalium* doivent impérativement valider tous les tests commerciaux ou les tests internes participant au dépistage de *M. genitalium*. Ils devraient également participer au programme d'évaluation externe de la qualité. En effet, cela a démontré une différence substantielle entre les laboratoires ayant participé à ce programme.

Concernant les recommandations Européennes en termes de thérapies, plusieurs traitements sont envisageables en fonction de la complexité de l'infection (figure 8) :

- Face à une infection non compliquée et une absence de résistance à la famille des macrolides et apparentés, l'azithromycine ou la josamycine peuvent être employées.
 - Pour l'azithromycine, une posologie dégressive sera pratiquée à savoir 500mg le premier jour puis 250mg du deuxième au cinquième jour.
 - Pour la josamycine, la posologie sera de 500mg trois fois par jour pendant dix jours.
- Face à une infection présentant une résistance à la famille des macrolides et apparentés, c'est la moxifloxacine qui est utilisée pendant sept à dix jours

avec une posologie de 400mg par jour. La durée du traitement est incertaine mais de meilleurs résultats ont été obtenus avec le traitement le plus long notamment en présence de cervicite.

- Face à une persistance de *M. genitalium* malgré les précédentes molécules, l'utilisation de la pristinamycine peut être envisagée et le traitement sera de 1g quatre fois par jour pendant dix jours. Il est important de bien respecter cette forte posologie pendant les dix jours de traitement car cette stratégie thérapeutique est la dernière ligne de traitement en cas d'échec des autres molécules. Donc le patient doit être relativement observant puisqu'une diminution de la posologie pourrait entraîner un échec thérapeutique. Néanmoins, l'échec de cette dernière antibiothérapie n'est pas forcément imputable à l'inobservance du patient.

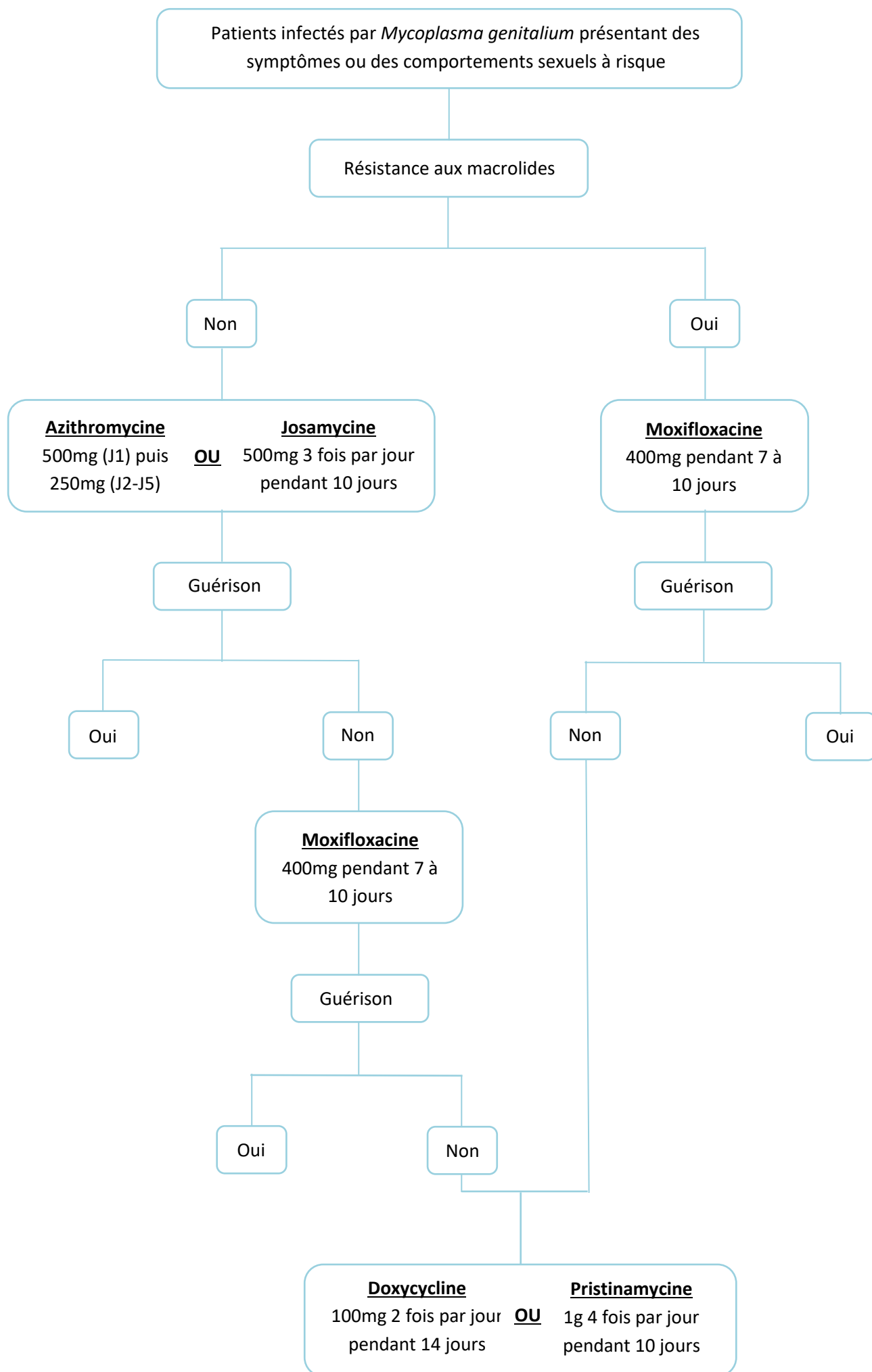


Figure 8: Traitement d'une infection par *M. genitalium* selon les recommandations Européennes

La pristinamycine est le seul antibiotique documenté en cas d'échec des autres traitements sauf en France où la doxycycline peut être utilisée en cas d'échec de l'azithromycine et/ou de la moxifloxacine. Le traitement sera alors de 100mg deux fois par jour pendant 14 jours. Ce protocole thérapeutique n'est appliqué qu'en France mais peut être utilisé dans les autres pays européens après l'obtention d'une autorisation.

Les recommandations Européennes préfèrent l'utilisation de l'azithromycine avec une posologie de 1,5g répartie sur 5 jours par rapport à une dose unique de 1g car cette dernière se montre moins efficace. En effet, la posologie d'une monodose d'azithromycine 1g était pratiquée auparavant mais une sélection de souches résistantes s'est développée et *in fine*, des échecs thérapeutiques [41]. Cependant, si le protocole consistant en l'administration d'une dose unique de 1g d'azithromycine fait l'objet d'un échec thérapeutique ou bien que des mutations à l'origine d'une résistance à la famille des macrolides préexistent, l'application du schéma thérapeutique utilisant l'azithromycine sur une durée prolongée ne permet pas d'éradiquer le germe.

Ces recommandations ne sont pas applicables à tous les patients notamment aux femmes enceintes. En cas de grossesse et d'une infection par une souche sensible à la famille des macrolides, l'azithromycine à 1,5g pendant 5 jours peut être utilisée. Par contre, si la patiente est enceinte et que la souche est résistante à la famille des macrolides, l'utilisation des autres classes d'antibiotiques n'est pas envisageable au vue du mauvais rapport bénéfices/risques. Il sera alors plus sage de reporter le traitement. En effet, l'utilisation de la famille des tétracyclines chez une femme enceinte au cours du deuxième et du troisième trimestre peut entraîner la coloration des dents du nouveau-né et l'utilisation de la famille des fluoroquinolones peut entraîner des atteintes articulaires.

Pourtant la transmission mère/nouveau-né de *M. genitalium* pendant l'accouchement n'est pas systématiquement étudiée car le portage de *M. genitalium* dans l'oropharynx est plutôt faible. Cela s'explique par le fait que le contact oral/génital n'intervient pas de manière significative dans la contamination. Toutefois, lors d'une grossesse avec une infection par *M. genitalium*, il est recommandé de surveiller le nouveau-né et de savoir détecter les signes d'une éventuelle infection notamment une conjonctivite ou une infection respiratoire.

Selon les recommandations Européennes, le traitement du patient infecté par *M. genitalium* ne suffit pas. Etant une IST, le(s) partenaire(s) sexuel(s) actuel(s) doit(vent) être aussi testé(s) et traité(s) par le même antibiotique que le patient index. En plus du traitement des partenaires sexuels actuels, il doit être proposé aux contacts sexuels récents (datant des trois derniers mois précédant l'infection du patient index) un dépistage de *M. genitalium* ainsi que des autres IST. L'éducation thérapeutique doit être faite auprès du patient index et de ses partenaires sexuels afin de les sensibiliser notamment sur les facteurs de risque :

- Avoir des relations sexuelles non protégées avec un partenaire présentant des symptômes de type urétrite, cervicite, écoulements, saignements au cours des rapports et douleurs pelviennes.
- Avoir des comportements sexuels à haut risque (rapports sexuels non protégés, plus de trois nouveaux partenaires sexuels au cours de la dernière année).
- Avoir des relations sexuelles avec un partenaire atteint d'IST.
- Avoir des rapports sexuels de type HSH.

Cette éducation thérapeutique se fait aussi par le biais de distribution de brochures informatives aux patients infectés et à leurs partenaires sexuels. Elle repose sur des explications portées sur la prévention, la transmission et les complications d'une infection par *M. genitalium*. L'éducation thérapeutique est aussi axée sur la conduite à tenir durant la totalité du traitement. Cela implique l'abstinence de relations sexuelles non protégées et ce, jusqu'à la résolution des symptômes et la négativité du TOC. Ce test de guérison est pratiqué systématiquement au vue de l'augmentation des résistances à la famille des macrolides. Seulement, une divergence est observée avec les recommandations de la société anglaise de santé

sexuelle (BASHH) qui n'indiquent pas de pratiquer ce test de guérison face à un patient asymptomatique. Pourtant, il serait intéressant de le pratiquer systématiquement d'autant plus que l'utilisation généralisée de l'azithromycine en dose unique de 1g sans vérification de l'éradication de *M. genitalium* par un test de guérison, contribue à l'augmentation de la résistance à la famille de macrolides.

Les recommandations Européennes préconisent d'effectuer le prélèvement utilisé pour le TOC au plus tôt trois semaines après le début du traitement. La plupart du temps, *M. genitalium* devient indétectable au bout d'une semaine de traitement mais il faut être vigilant face à un résultat qui semble négatif puisque des faux négatifs ont été reportés.

b) Les recommandations de la BASHH

Les experts de la BASHH (British Association of Sexual Health and HIV) en 2018 recommandent face à un tableau clinique d'urétrite chez un homme et un syndrome inflammatoire pelvien chez une femme de rechercher systématiquement la présence de *M. genitalium*. Cette recherche est aussi à effectuer chez les partenaires sexuels des patients positifs à *M. genitalium*. De plus, le traitement ne s'adresse qu'aux patients symptomatiques ainsi qu'à leur(s) partenaire(s) sexuel(s) même si ces derniers sont asymptomatiques [4]. Une abstinence sexuelle doit être conduite jusqu'à la fin du traitement ainsi qu'un test contrôle cinq semaines après.

Le premier jet des urines chez les hommes et l'écouvillon vaginal chez les femmes sont les meilleurs choix d'échantillonnage pour la recherche de *M. genitalium*. Enfin, dans la mesure du possible, tous les échantillons positifs pour *M. genitalium* doivent faire l'objet d'une recherche de mutations induisant une résistance aux macrolides.

Les patients ayant été traités pour une infection à *M. genitalium* doivent effectuer un TOC cinq semaines, voire au minimum trois semaines, après l'initiation du traitement pour s'assurer de l'absence du germe. Il faut tout de même faire attention à l'interprétation de certains résultats qui pourrait s'avérer être de faux négatifs notamment quand la charge bactérienne est basse en début de traitement.

Deux stratégies thérapeutiques sont recommandées en fonction de la gravité de l'infection [4]. Pour une infection non compliquée à *M. genitalium* :

- Si le germe est sensible aux macrolides ou que le statut de résistance du germe est inconnu, le traitement repose sur deux prises de doxycycline 100mg durant sept jours, suivi d'une dose unique d'azithromycine 1g et enfin une prise d'azithromycine 500mg pendant deux jours.
- Si le germe a développé une résistance aux macrolides ou que le traitement précédant utilisant l'azithromycine a échoué, le traitement repose alors sur la prise de 400mg de moxifloxacine durant dix jours.

La notion d'échec du traitement par azithromycine est évaluée par la persistance des symptômes après traitement ou lorsque le TOC reste positif malgré l'attente des cinq semaines après le début du traitement.

Pour une infection à *M. genitalium* avec complications, le traitement sera d'une prise de 400mg de moxifloxacine pendant quatorze jours. Les autres fluoroquinolones ne sont pas privilégiées car peu actives. Des traitements alternatifs sont également disponibles si les précédents ne sont pas concluants. La BASHH propose quatre possibilités de prise en charge [4] :

- Deux prises par jour de doxycycline 100mg durant sept jours suivis de quatre prises par jour de pristinaamycine 1g pendant dix jours.
- Quatre prises par jour de pristinaamycine 1g pendant dix jours.
- Deux prises par jour de doxycycline 100mg durant quatorze jours.
- Deux prises par jour de minocycline 100mg durant quatorze jours.

Ces alternatives thérapeutiques doivent être étudiées et choisies avec discernement car elles ont jusqu'alors très peu de preuves quant à leurs efficacités.

De plus, la pristinamycine n'est actuellement pas disponible au Royaume-Uni et doit donc être importée pour que les patients puissent bénéficier de ce traitement [42].

Dans le cadre où la patiente est enceinte ou allaite, la BASHH préconise une autre stratégie thérapeutique. Si durant sa grossesse, la patiente présente une infection à *M. genitalium* non compliquée, le traitement sera basé sur trois jours d'azithromycine. En cas de résistance aux macrolides, la moxifloxacin, qui serait habituellement le traitement de deuxième intention, ne peut être envisagée car elle représente une contre-indication durant la grossesse. La FDA considère que l'utilisation de la doxycycline est envisageable pendant le premier trimestre de grossesse mais que, si cela est possible, le traitement devrait être repoussé après la grossesse.

Contrairement aux femmes enceintes, les femmes qui allaitent ne peuvent utiliser la doxycycline comme alternative car celle-ci est excrétée dans le lait maternel et représente alors une contre-indication au vu de ses effets indésirables irréversibles sur le nourrisson (décoloration des dents et altération de la croissance osseuse). Les femmes allaitant peuvent par contre utiliser l'azithromycine car le passage dans le lait maternel est faible mais l'apparition d'effets indésirables, notamment en bousculant l'équilibre de la flore gastro-intestinale peut se traduire par des diarrhées et des candidoses, reste à surveiller.

Objectifs

Etude de la prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez *M. genitalium* en France d'Outre-Mer en 2018.

L'objectif de cette étude est de définir la prévalence des résistances aux deux principales familles d'antibiotiques actives sur *M. genitalium* à savoir les macrolides et les fluoroquinolones et ce, dans les territoires ultra-marins. L'obtention de ces prévalences permettra de les comparer à celles obtenues la même année en France métropolitaine.

Matériels et Méthodes

I. Patients et échantillons inclus dans l'étude

L'étude réalisée au cours de ce projet s'intéresse rétrospectivement aux échantillons positifs pour *M. genitalium* recensés par des laboratoires des territoires ultra-marins et envoyés au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux (33) du 1^{er} août au 31 octobre 2018. Leurs prélèvements ont été adressés par transporteur au CNR des IST qui est hébergé par le CHU de Bordeaux. L'enregistrement des différents échantillons s'est déroulé de manière anonyme et l'étude s'est faite à partir des extraits d'ADN des échantillons conservés à -20°C. Ces échantillons provenaient de différents sites de prélèvements à savoir les urines, le vagin, le col de l'utérus, l'anus et le pharynx.

Cette étude s'est portée sur 287 échantillons positifs à *M. genitalium* provenant des différents territoires ultra-marins à savoir la Guyane Française, Mayotte, La Réunion, La Nouvelle Calédonie et La Polynésie Française (figure 9).

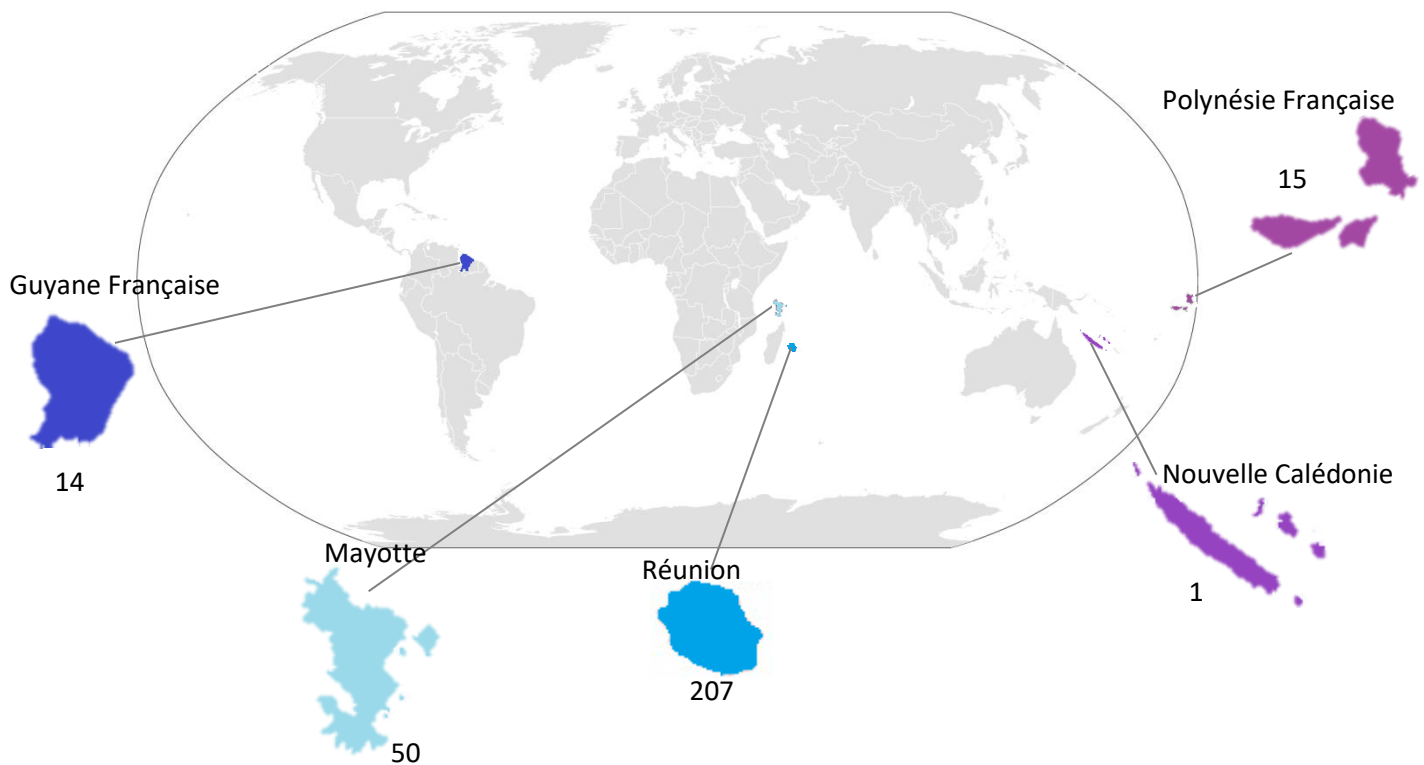


Figure 9: Planisphère recensant la provenance des différents échantillons envoyés au CNR des IST de Bordeaux

En plus de l'envoi d'échantillons positifs à *M. genitalium*, le CNR des IST avait demandé aux différents centres de remplir un questionnaire concernant les patients participant à l'étude. Ce questionnaire comportait les informations suivantes concernant le patient : son année de naissance, son âge, son sexe, son statut VIH, la présence de *C. trachomatis*, ses pratiques sexuelles, le motif de la consultation et si un traitement antérieur par macrolides avait été envisagé ; ainsi que les données du centre expéditeur, l'identifiant interne de l'échantillon et l'identifiant donné par le CNR, le site de prélèvement de l'échantillon, la date du prélèvement, les dates de réception.

II. Extraits d'ADN et choix de la PCR

➤ Extraits d'ADN

Les extraits d'ADN ont été réalisés à partir de 200µL du prélèvement initial réceptionné avec le MagNA Pure 96 Instrument et le Viral NA Small Volume Kit (Roche diagnostic). Le volume d'élution de l'extrait d'ADN est de 100µL. Un extrait de la souche de référence a été utilisé comme contrôle positif des différentes PCR. La souche de référence pour *M. genitalium* est G37 (ATCC 33530). Son génome complet est disponible sur GenBank [43].

Les extraits d'ADN ont été stockés à 4°C avant la réalisation des PCR de détection.

➤ Choix de la PCR

La nature de la PCR employée pour mettre en évidence une mutation au sein de *M. genitalium* entraînant une résistance aux macrolides et/ou aux fluoroquinolones est fonction de la cible de la famille des antibiotiques. C'est la PCR en temps réel de type FRET qui a été utilisée pour détecter une résistance aux macrolides alors que c'est la PCR en point final et un séquençage qui a été utilisée pour détecter une résistance aux fluoroquinolones.

N'étant pas les mêmes cibles dans le cas d'une recherche de résistance aux macrolides et dans celui d'une recherche de résistance aux fluoroquinolones, les amorces entourant la séquence cible à amplifier ainsi que les sondes ne sont pas les mêmes (voir tableaux 3, 4 et 9).

La séquence ciblée au cours de la PCR en point final pour mettre en évidence la présence de mutations entraînant une résistance aux fluoroquinolones se situe au niveau du gène *parC* tandis que celle ciblée au cours de la PCR en temps réel de type FRET pour mettre en évidence la présence de mutations entraînant une résistance aux macrolides se situe au niveau du gène de l'ARNr 23S.

III. Méthode de détection de la résistance aux macrolides

Pour détecter une éventuelle résistance aux macrolides et donc une mutation dans la séquence du gène de l'ARNr 23S, les extraits d'ADN ont été soumis à une PCR en temps réel de type FRET [34] afin d'amplifier la séquence cible d'intérêt. Une PCR multiplex appelée *SpeeDx ResistancePlus*[®] MG [44] a été réalisée sur les extraits d'ADN n'ayant pas été amplifiés par la PCR de type FRET.

a) PCR FRET et séquençage de l'ARNr 23S

Les amorces et sondes utilisées lors de la PCR de type FRET sont recensées dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3: Amorces utilisées lors de la PCR de type FRET

Gène	Nom des amorces	Séquence (5' → 3')	Taille du produit (pb)
ARNr 23S	F1-Mg	GAAGGAGGTTAGCAATTTATTGC	266
	R1-Mg	TTCTCTACATGGTGGTGTTTTG	

Tableau 4: Sondes utilisées lors de la PCR de type FRET

Gène	Nom des sondes	Séquence (5'→ 3')	Taille du produit (pb)
ARNr 23S	A-2058Hp	CGGGTGAAGACACCCGTTAGGC – fluorescéine	266
	S-2058Hp	LC-red 640- ACGGGACGGAAAGACC – phosphate	

Le mélange réactionnel (tableau 5) utilisé pour l'amplification des extraits d'ADN a été réalisé avec le kit LightCycler Fast Start DNA Master HybProbes (Roche). Ce mélange est composé des sondes, des amorces, et d'un mastermix contenant les bases nucléotidiques ainsi qu'une Taq polymérase qui sont nécessaires à la réalisation d'une PCR. Cette Taq polymérase est une ADN polymérase capable de résister à la chaleur et reste intacte lors de la dénaturation de l'ADN [45]. L'activité de la Taq polymérase est renforcée par le co-facteur $MgCl_2$ qui aide la Taq polymérase à incorporer les bases nucléotidiques durant la polymérisation. La fluorescence est émise lorsque les deux sondes s'hybrident.

Tableau 5: Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR de type FRET

Produits	Concentration initiale (µM)	Concentration finale (µM)	Volume pour 1 réaction (µL)	Volume pour 10 réactions (µL)
H ₂ O	-	-	5,4	54
Master mix	10X	1X	2	20
MgCl ₂	Fourni	fourni	1.6	16
F1-Mg	5	0.25	1	10
R1-Mg	5	0.25	1	10
A-2058Hp	2	0.2	2	20
S-2058Hp	2	0.2	2	20
Volume final (µL)	-	-	15	150

Le tableau 5 permet de connaître la quantité des différents composants du mélange réactionnel pour obtenir un volume réactionnel final de 15µL. Les réactions de PCR contiennent un volume final de 20µL correspondant au 15µL de mélange réactionnel et au 5µL d'extrait d'ADN. Le témoin positif est lui composé de la même quantité de mélange réactionnel et de 5µL d'un extrait d'ADN de la souche de référence G37 et le puits témoin négatif contiendra le mélange réactionnel.

Les tubes de PCR présentés en barrette sont alors placés dans l'amplificateur cobas Z480 (Roche) et le programme d'amplification utilisé est présenté dans le tableau 6.

Tableau 6: Programme d'amplification pour réaliser la PCR de type FRET

Programme	Etape	Température (°C)	Temps (min : sec)	Nombre de cycle
Dénaturation	-	95	10 : 00	1
Amplification	Dénaturation	95	00 : 10	50
	Hybridation	58	00 : 20	
	Elongation	72	00 : 20	
Courbe de fusion	Dénaturation	95	00 : 30	1
	Hybridation	40	00 : 40	
	Acquisition de la fluorescence en continu	Rampe de température de 40 à 80°C	1 acquisition par °C	
Refroidissement	-	1	00 : 30	1

A l'issue de ce programme d'amplification, des courbes de fusion ou de dissociation sont obtenues grâce à l'émission de fluorescence produite par les sondes (figure 10) Pour cela, l'intensité de fluorescence est mesurée en continu et la courbe de fusion est obtenue en réalisant une rampe de température de 40°C à 80°C par palier de 0,1°C. Les pics de chaque courbe représentent les T_m pour chaque extrait d'ADN. La valeur du T_m est dépendante de la composition nucléotidique du fragment amplifié.

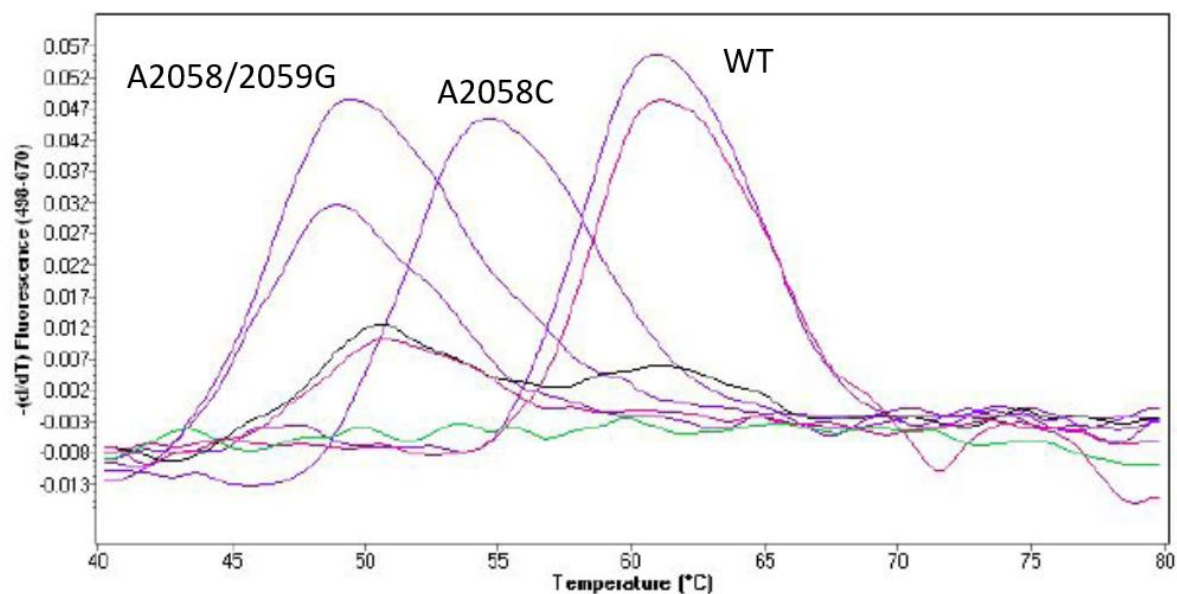


Figure 10: Courbes de fusion obtenues lors du programme d'amplification de la PCR de type FRET en fonction de la séquence de l'ARNr 23S amplifiée

En effet, d'après le tableau 7, chaque produit d'amplification est caractérisé par son T_m . Il n'est malheureusement pas possible d'identifier si la mutation est due au changement A2058G ou A2059G en ne se basant que sur la valeur du T_m . Un séquençage est alors nécessaire pour connaître la position exacte de la mutation.

Tableau 7: Températures de fusion en fonction de la nature de la mutation

Mutation	T_m (°C)
WT	60
A2058C	55
A2058T	52
A2058G/ A2059G	50

A l'issue de l'obtention des courbes de fusion, les produits PCR déterminés comme mutés ont été envoyés à Eurofins[®] genomics pour être purifiés puis séquencés par la méthode de Sanger. Pour ce faire, l'envoi de 15µL de produit PCR et 10µL d'amorce (concentration à 10µM) sont nécessaires par réaction. L'amorce sens F1-Mg est celle utilisée pour le séquençage d'un seul brin d'ADN. Les séquences d'ADN obtenues ont été analysées et comparées à la séquence de référence de la souche G37 avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor afin de déterminer la position exacte de la mutation.

b) *ResistancePlus*[®] MG (SpeedX)

Cependant, tous les extraits d'ADN n'ont pas été amplifiés lors de la PCR de type FRET. L'utilisation de la technique SpeedX a son intérêt dans ce cas de figure puisque le kit *ResistancePlus*[®] MG est capable de détecter simultanément *M. genitalium* et cinq mutations (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C) sur le gène de l'ARNr 23S associées à la résistance à l'azithromycine [44]. Le kit *ResistancePlus*[®] MG est un test par PCR en temps réel multiplexe à un puits composé de trois systèmes de lecture :

- Le Readout 1 (système de lecture 1) qui indique la présence ou l'absence de *M. genitalium* en détectant le gène MgPa.
- Le Readout 2 (système de lecture 2) qui indique la présence d'une des cinq mutations que la technique est capable de détecter.
- Le Readout 3 (système de lecture 3) qui est un contrôle interne dont la fonction est de surveiller l'efficacité de détection ainsi que la présence potentielle d'inhibiteurs de la PCR.

Le mix PCR a été réalisé selon les instructions du kit. L'amplification a été réalisée sur l'instrument LC 480 II (Roche) selon le programme d'amplification décrit par l'industriel (tableau 8). Enfin, l'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel UgenTec FastFinder qui réalise l'interprétation des données.

Tableau 8: Programme d'amplification selon le kit *ResistancePlus*® MG

Programme	Cycle	Température (°C)	Temps (min : sec)
Activation de la polymérase	1	95	2 : 00
Cyclage par essais : incrément – 0,5°C/cycle	10	95	00 : 05
		61 - 56,5	00 : 30
Acquisition/Détection	40	95	00 : 05
		52	00 : 40
Refroidissement	1	40	00 : 30

La limite de cette méthode est qu'elle ne fournit pas la position de la mutation mais seulement si une des cinq mutations a été détectée. Le séquençage de l'extrait d'ADN n'est pas réalisable après l'utilisation de la technique SpeedX.

IV. Méthode de la détection de la résistance aux fluoroquinolones

Pour détecter une résistance aux fluoroquinolones et donc une mutation dans la séquence du gène *parC* de la topoisomérase IV, les extraits d'ADN ont été soumis à une PCR en point final ciblant la zone de mutation du gène *parC* appelée QRDR, suivie d'un séquençage [46]. Les caractéristiques des amorces utilisées pour amplifier la séquence cible du gène *parC* sont décrites dans le tableau 9.

Tableau 9: Amorces utilisées lors de la PCR en point final du gène *parC* selon Shimada *et al.* [47]

Gène	Noms des amorces	Séquences (5'→ 3')	T _m (°C)	Taille du produit (pb)
<i>parC</i>	MG-PARC-A	TGGGCTTAAAACCCACCACT	58,4	214
	MG-PARC-B	CGGGTTTCTGTGTAACGCAT		

Le mélange réactionnel utilisé (tableau 10) pour l'amplification des extraits d'ADN a été réalisé avec le kit GoTaq G2 Hot start polymerase (Promega).

Tableau 10: Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR en point final du gène *parC*

Produits	Concentration initiale (μM)	Concentration finale (μM)	Volume pour 1 réaction (μL)	Volume pour 10 réactions (μL)
Tampon Taq	5X	1X	10	100
MgCl₂	25mM	1,5mM	3	30
dNTP	10mM	200	1	10
MG-PARC-A	100	0,2	0,5	5
MG-PARC-B	100	0,2	0,5	5
Taq polymérase	5U/μL	5U/μL	0,2	2
H₂O	-	-	29,8	298
Volume final (μL)	-	-	45	450

Le tableau 10 permet de connaître la quantité des différents composants du mélange réactionnel pour obtenir un volume réactionnel final de 45μL. Les réactions de PCR sont composées de 45μL de mélange réactionnel et de 5μL d'extrait d'ADN. Le témoin positif est lui composé de la même quantité de mélange réactionnel et de 5μL d'un extrait d'ADN de la souche de référence G37 et le puits témoin négatif contiendra du mélange réactionnel.

L'amplification a été réalisée avec le thermocycleur Mastercycler epgradient S (Eppendorf) en suivant le programme d'amplification rapporté dans le tableau 11.

Tableau 11: Programme d'amplification pour réaliser la PCR en point final ciblant le gène *parC*

Programme	Etape	Température (°C)	Temps (min : sec)	Nombre de cycle
Dénaturation	-	95	15 : 00	1
Amplification	Dénaturation	95	00 : 30	40
	Hybridation	58	00 : 30	
	Elongation	72	00 : 30	
Elongation	-	72	10 : 00	1
Refroidissement	-	14	∞	1

Suite au programme d'amplification, les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose de 2% contenant 5µL pour 100µL d'un intercalant d'ADN (Midori Green®) afin d'être détectés par électrophorèse. Un volume de 5µL d'amplifiât ou de marqueur de taille (Thermo Scientific 100pb) ont été utilisés et le tampon de migration utilisé était le TAE (Eurobio®) concentré à 1X. La durée de la migration des produits de PCR était de 20 minutes à 100V. Une fois la migration terminée, le gel a été révélé sous ultra-violet (254nm) puis photographié.

Les produits PCR amplifiés ont été envoyés à Eurofins® genomics pour être purifiés et séquencés par la méthode de Sanger. Pour ce faire, l'envoi de 15µL de produit PCR et 10µL d'amorce (concentration à 10µM) sont nécessaires par réaction. L'amorce sens MG-PARC-A est celle utilisée pour le séquençage. Les séquences d'ADN obtenues ont été analysées et comparées à la séquence de référence de la souche G37 avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor afin de déterminer si la séquence était sauvage ou mutée. En cas de mutation, la séquence d'ADN a été traduite en séquence protéique avec le logiciel du site <http://www.bioinformatics.org/sms/>. Les séquences protéiques des produits PCR mutés sont ensuite comparées à celle de la souche de référence G37 afin de constater si la modification d'un acide aminé est connue et associée à une résistance aux fluoroquinolones.

➤ Mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones

La présence de mutations dans la séquence du gène *parC* n'aboutit pas forcément à une résistance. En effet, certains changements d'acides nucléotidiques n'entraînent pas de changements d'acides aminés et donc, *in fine*, de changement dans la composition de la protéine finale. Cela s'explique par le fait que le code génétique est redondant. Dans d'autres cas, le changement d'acide nucléotidique entraîne un changement d'acide aminé. Seules certaines combinaisons et positions spécifiques de changement dans la protéine ParC sont impliquées dans la résistance aux antibiotiques.

A ce jour, cinq mutations ont été décrites comme associées au développement de résistance aux fluoroquinolones (tableau 12).

Tableau 12: Mutations connues au niveau de la protéine ParC associées à la résistance aux fluoroquinolones chez *M. genitalium*

Position de la mutation dans la protéine ParC
Gly81Cys
Ser83Arg
Ser83Ile
Asp87Asn
Asp87Tyr

Résultats

I. Epidémiologie de la cohorte ultra-marine

Tous les résultats décrits ci-dessous ne tiendront pas compte des neufs tubes reçus vides. Donc l'étude portera sur 278 échantillons.

Comme le montre la figure 11, la majorité des prélèvements proviennent de la Réunion. La plupart des prélèvements sont issus des laboratoires de biologie médicale Réunilab (156 prélèvements) et le reste du CHU de la Réunion (51 prélèvements).

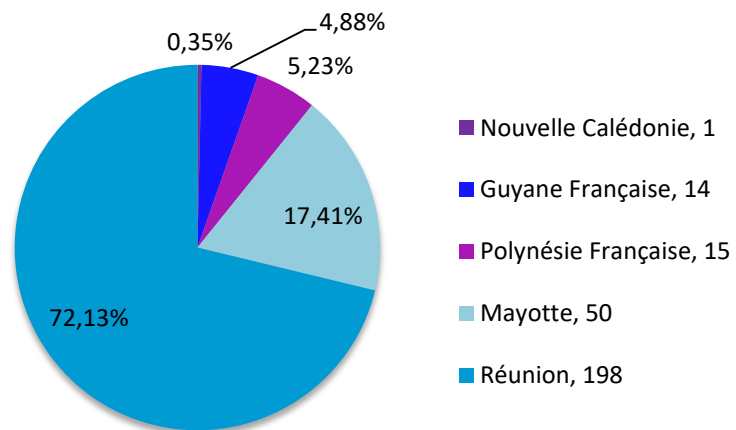


Figure 11: Provenance des échantillons en pourcentage

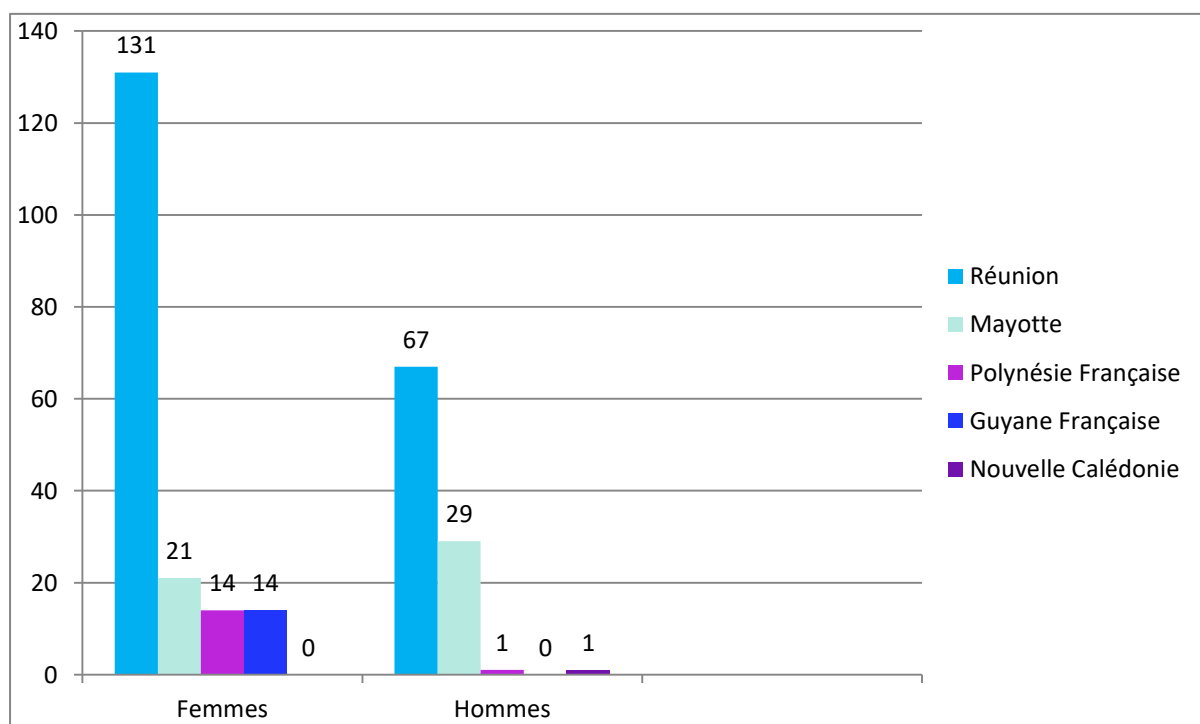


Figure 12: Répartition des échantillons selon la localisation géographique et le sexe des patients

D'après la figure 12 la répartition des échantillons n'est pas homogène au sein des différents territoires ultra-marins. Il aurait été préférable de recevoir une quantité équivalente d'échantillons auprès de chaque territoire ultra-marin pour une comparaison plus robuste.

Tableau 13: Répartition des échantillons en fonction de l'âge et du sexe des patients

Tranches d'âge	Hommes	Femmes	Total
De 10 à 20 ans	17	44	61
De 21 à 30 ans	43	90	133
De 31 à 40 ans	23	31	54
De 41 à 50 ans	10	13	23
De 51 à 60 ans	4	2	6
De 61 à 70 ans	1	0	1
Total :	98	180	278

Nous interpréterons cette répartition en supposant que les femmes n'ont pas plus tendance que les hommes à se présenter à l'hôpital pour se faire soigner (pas de biais lié au sexe) et que le fait de se présenter à l'hôpital est indépendant de l'âge de l'individu (pas de biais lié à l'âge). Le tableau 13 montre alors une réelle prédominance d'infections par *M. genitalium* chez les femmes (180 patientes) par rapport aux hommes (98 patients). Ramené en pourcentage, parmi les 278 échantillons, 64,75% proviennent de patients de sexe féminin contre 35,25% provenant de patients de sexe masculin.

La tranche d'âge présentant le plus de patients infectés par *M. genitalium* est celle des 21 à 30 ans et l'âge médian de cette population est de 26 ans.

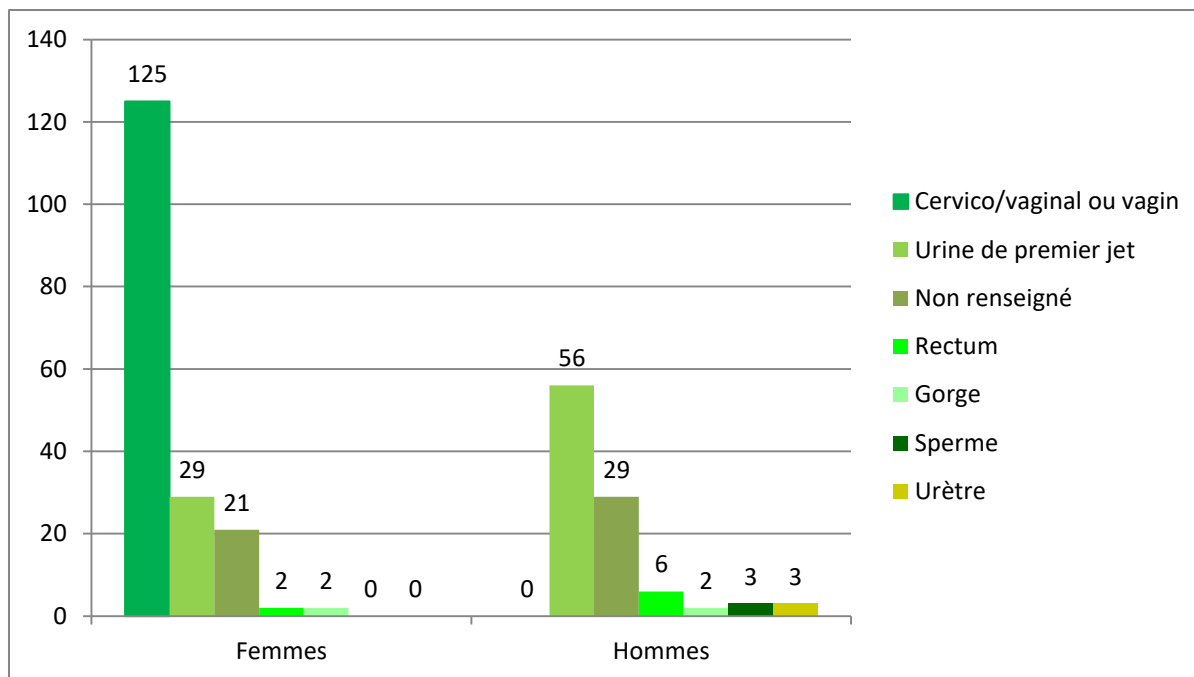


Figure 13: Répartition des échantillons en fonction du sexe des patients et du site de prélèvement

Le type de prélèvement le plus référencé dans la population féminine est le prélèvement cervico-vaginal ou le prélèvement vaginal et dans la population masculine est le prélèvement des urines de premier jet (figure 13).

Tableau 14: Co-infection avec *C. trachomatis*

<i>C. trachomatis</i>	Femmes	Hommes	Total
Présence	30	14	44
Absence	150	84	234
Total	180	98	278

Il est intéressant de rechercher parmi les 278 échantillons positifs à *M. genitalium* si *C. trachomatis* est également présente et donc s'il y a une co-infection. En effet, 16,66% (30/180) des femmes et 14,28% (14/98) des hommes inclus dans cette étude sont infectés par les deux bactéries, ce qui représente 15,83 % (44/278) de patients co-infectés dans notre cohorte (tableau 14).

Le CNR des IST avait demandé aux différents centres de remplir un questionnaire concernant les patients participant à l'étude (cf I- Patients et échantillons inclus dans l'étude) mais il a été malheureusement difficile de comparer les réponses à ce questionnaire car seuls le CHU de la Réunion, l'institut Pasteur Cayenne de Guyane, la Polynésie Française et la Nouvelle Calédonie y ont entièrement répondu (ce qui représente 81 échantillons). Les comparaisons n'ont donc été faites que sur leurs réponses données.

Concernant le statut VIH de ces 81 patients, seulement huit étaient positifs au dépistage du virus (9,9%). Ces huit échantillons provenaient du CHU de la Réunion et n'appartenaient qu'à des hommes (tableau 15). Parmi ces huit hommes, six avaient des relations sexuelles avec des hommes (75%).

Tableau 15: Répartition du statut VIH selon le sexe et la géolocalisation

Statut VIH DROM	Inconnu		Négatif		Positif	
	F	H	F	H	F	H
CHU Réunion	6	1	19	17	-	8
Polynésie	8	1	6	-	-	-
Guyane	-	-	14	-	-	-
Noumea	-	-	-	1	-	-
Total selon le sexe	14	2	39	18	0	8
Total tout sexe confondu	16		57		8	

Parmi les patients du CHU de la Réunion qui ont répondu à la question concernant la prise antérieure d'antibiotiques, certains d'entre eux ont eu recours à un traitement par macrolides avant cette étude. Sur les 51 patients du CHU de la Réunion, seulement six patients avaient déjà été traités auparavant par des antibiotiques de la famille des macrolides soit 11,76% (tableau 16).

Tableau 16: Connaissance de la prise antérieure de macrolides par les patients du CHU de la Réunion

Traitement antérieur par macrolides	Patients du CHU de la Réunion
Oui	6
Non	19
Inconnu	26
Total	51

II. Résistance aux macrolides dans les territoires ultra-marins

Au total, 195 échantillons ont été amplifiés par la technique de la PCR de type FRET et 83 échantillons ont été testés avec la technique SpeedX pour être amplifiés et déterminer si une mutation était présente ou non.

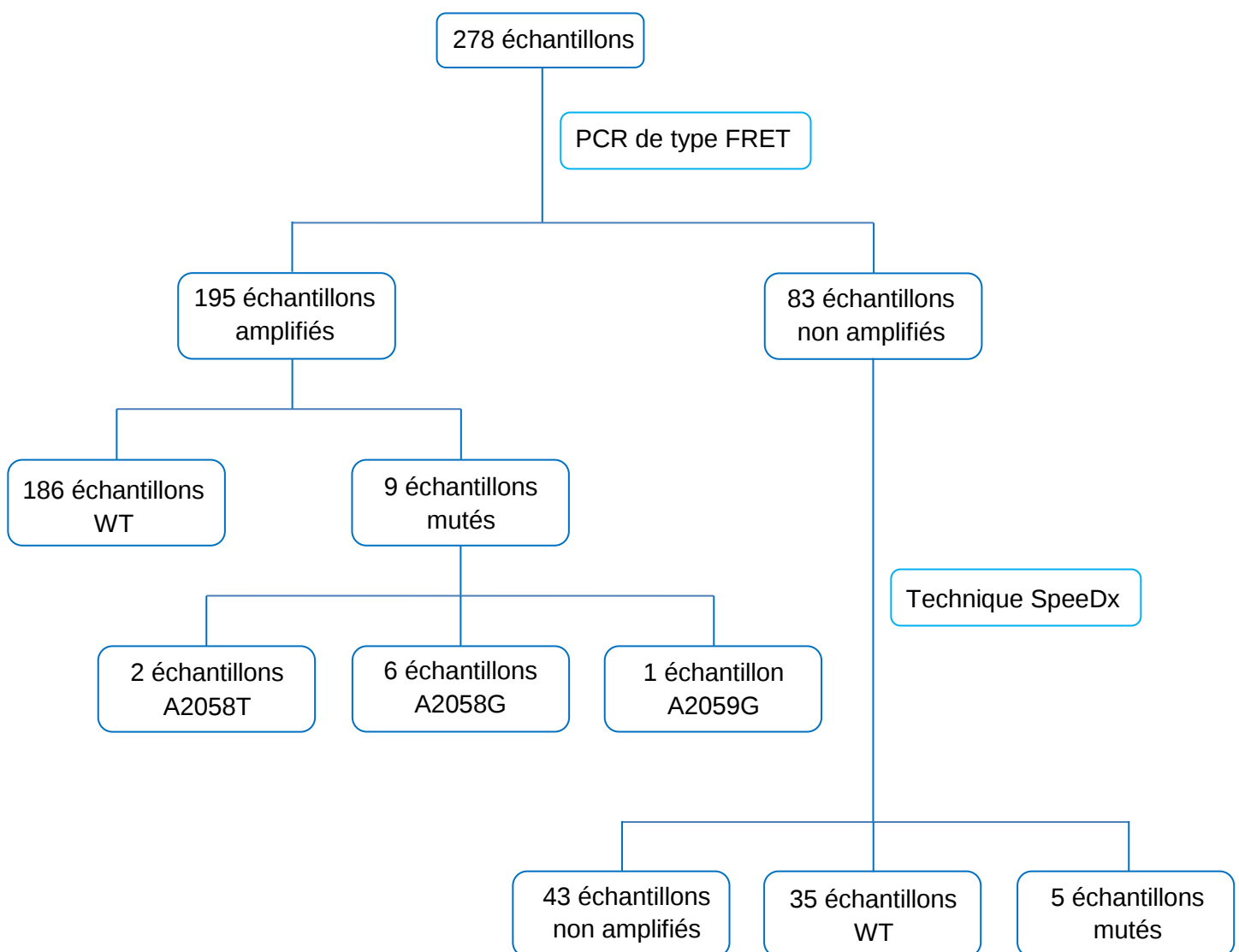


Figure 84: Résultats obtenus suite à une PCR de type FRET avec ou sans la technique SpeedX pour le dénombrement de mutations présentes dans la cohorte étudiée

D'après la figure 14, les échantillons n'ayant pas été amplifiés par la PCR de type FRET et qui ont été soumis à la technique SpeedX n'ont pas tous été amplifiés (seulement 40 sur 83). Au total, sur les 278 échantillons testés, 235 échantillons ont été amplifiés par l'une des techniques disponibles (84,5%). 221 échantillons présentaient une souche sauvage (94,04%) et 14 échantillons présentaient une mutation au sein de l'ARNr 23S, ce qui correspond à une **prévalence de la résistance aux macrolides de 5,96% (14/235)**.

Tableau 17: Provenance des différentes souches mutées en fonction de la nature de la mutation

Provenance des échantillons mutés	A2058T	A2058G	A2059G	ARNr 23S muté	Total
CHU de la Réunion	-	5	1	-	6
Réunilab	2	1	-	4	7
Guyane	-	-	-	1	1
Total	2	6	1	5	14

D'après le tableau 17, la majorité des échantillons mutés (13 échantillons sur 14) proviennent de la Réunion et la mutation la plus représentée est la mutation A2058G que l'on ne retrouve que chez les patients réunionnais (six échantillons sur 14 soit 42,9%).

Tableau 18: Information sur les patients présentant une souche mutée au niveau du gène de l'ARNr 23S

Patients	Sexe	Age	Mutation	Prise antérieure de macrolides	Statut VIH	Présence de <i>C. trachomatis</i>
Patient 11	F	18	A2059G	Oui	Négatif	Positif
Patient 14	H	34	A2058G	Oui	Négatif	Négatif
Patient 19	H	31	A2058G	Non	Négatif	Positif
Patient 21	F	27	A2058G	Inconnue	Inconnu	Négatif
Patient 37	H	57	A2058G	Non	Positif	Négatif
Patient 42	H	33	A2058G	Non	Positif	Négatif
Patient 60	F	18	A2058T	Inconnue	Inconnu	Positif
Patient 62	F	23	23S muté	Inconnue	Inconnu	Positif
Patient 65	F	40	23S muté	Inconnue	Inconnu	Positif
Patient 122	F	28	A2058T	Inconnue	Inconnu	Positif
Patient 158	H	24	23S muté	Inconnue	Inconnu	Négatif
Patient 165	F	26	23S muté	Inconnue	Inconnu	Négatif
Patient 175	F	35	A2058G	Inconnue	Inconnu	Négatif
Patient 233	F	21	23S muté	Inconnue	Négatif	Négatif

Parmi les 14 patients dont les échantillons présentaient une mutation associée à une résistance aux macrolides, six étaient co-infectés par *C. trachomatis* soit 42,9% (tableau 18).

La connaissance d'une ou d'éventuelle(s) prise(s) antérieure(s) d'antibiotiques de la famille des macrolides serait intéressante pour établir un lien avec la présence de mutation. Seul le CHU de la Réunion nous a fourni cette information (tableau 15). Sur les six patients présentant une souche mutée, 33,33% (2/6) avaient déjà pris auparavant un traitement comportant des antibiotiques de la famille des macrolides (tableau 16). Parmi ces six patients, 33,33% (2/6) étaient positifs quant à la détection du VIH.

III. Résistance aux fluoroquinolones dans les territoires ultra-marins

245 échantillons ont été amplifiés par la technique de la PCR en point final et ont donc pu être séquencés afin de connaître la présence ou non de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones.

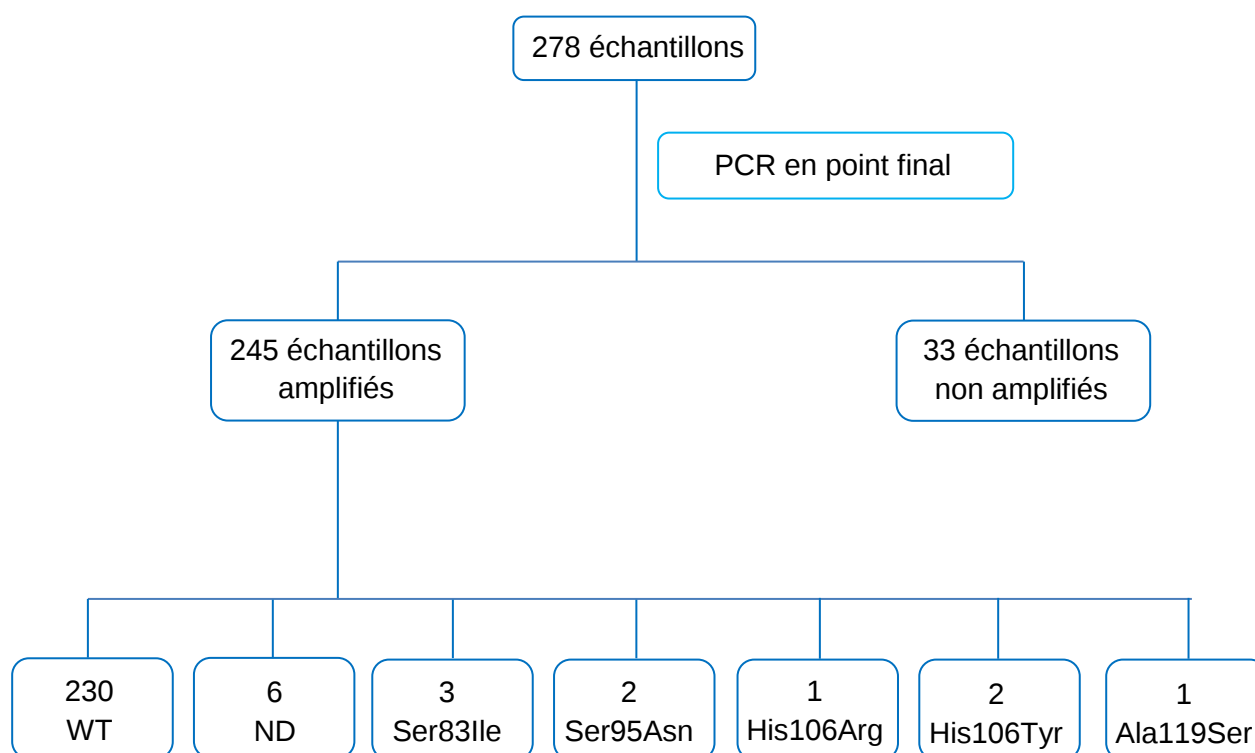


Figure 9: Résultats obtenus suite à une PCR en point final pour le dénombrement des mutations présentes dans la cohorte étudiée
(ND : non déterminé)

D'après la figure 15, sur les 245 échantillons amplifiés (soit 88,1%), 230 échantillons hébergeaient une souche sauvage. Cela signifie que ces 230 patients sont réceptifs au traitement par fluoroquinolones puisque ces souches sauvages y sont sensibles (93,4%). Neuf échantillons hébergeaient une mutation de la protéine ParC (3,7%) et le séquençage des six échantillons restants n'était pas interprétable.

Toutes les mutations recensées lors du séquençage des 245 échantillons amplifiés n'aboutissent pas forcément au développement d'une résistance aux fluoroquinolones (voir le tableau 12 qui recense les mutations associées à une résistance aux fluoroquinolones). En effet, sur les neuf échantillons présentant une souche mutée, seulement trois échantillons provenant de la Réunion présentent une souche dont la mutation engendre une résistance aux fluoroquinolones (tableau 19). Cette mutation est due au changement de la sérine par de l'isoleucine en position 83. Donc, la **prévalence de la résistance aux fluoroquinolones en 2018 dans les territoires ultra-marins était de 1,2% (3/245)**.

Tableau 19: Informations sur les patients présentant une souche mutée au niveau de la protéine ParC

Patients	Sexe	Age	Mutation	Prise antérieure de macrolides	Statut VIH	Présence de <i>C. trachomatis</i>
Patient 72	H	53	Ser83Ile	Inconnue	Inconnu	Négative
Patient 111	F	23	Ser83Ile	Inconnue	Inconnu	Négative
Patient 124	H	41	Ser83Ile	Inconnue	Inconnu	Négative

Il peut être intéressant de regarder si les échantillons ayant une mutation au niveau de l'ARNr 23S présentent aussi une mutation au niveau de la protéine ParC et inversement.

Tableau 20: Statut mutationnel des échantillons présentant une mutation associée à une résistance antibiotique

Patients	Sexe	Age	Mutation ARNr 23S	Mutation ParC
Patient 11	F	18	A2059G	WT
Patient 14	H	34	A2058G	WT
Patient 19	H	31	A2058G	WT
Patient 21	F	27	A2058G	WT
Patient 37	H	57	A2058G	WT
Patient 42	H	33	A2058G	WT
Patient 60	F	18	A2058T	WT
Patient 62	F	23	23S muté	Non amplifié
Patient 65	F	40	23S muté	Non amplifié
Patient 72	H	53	WT	Ser83Ile
Patient 111	F	23	WT	Ser83Ile
Patient 122	F	28	A2058T	WT
Patient 124	H	41	WT	Ser83Ile
Patient 158	H	24	23S muté	WT
Patient 165	F	26	23S muté	WT
Patient 175	F	35	A2058G	WT
Patient 233	F	21	23S muté	WT

Dans ces échantillons, aucune souche ne présente de double mutation (tableau 20). Soit la mutation présente dans l'échantillon concerne le gène de l'ARNr 23S, soit elle concerne la protéine ParC. Ce qui signifie que les souches présentant une mutation au niveau du gène de l'ARNr 23S seront résistantes aux macrolides mais sensibles aux fluoroquinolones et inversement, celles présentant une mutation au niveau de la protéine ParC seront résistantes aux fluoroquinolones mais sensibles aux macrolides. Etant donné qu'aucune double mutation n'a été recensée, la guérison de ces 17 patients sera envisageable par l'une des deux classes antibiotiques.

Discussion - Conclusion

Ces données concernent essentiellement la Réunion et Mayotte et y montrent une faible **prévalence de 5,96% pour la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et de 1,2% pour la résistance de *M. genitalium* aux fluoroquinolones en 2018 dans les territoires ultra-marins.**

Ces valeurs contrastent avec les prévalences obtenues durant la même période en métropole par le CNR des IST bactériennes. En effet, les prévalences de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en métropole étaient respectivement de 43% et 17,9% [48]. Cette différence notable peut s'expliquer de plusieurs façons. En France métropolitaine, le recours aux macrolides et aux fluoroquinolones en traitement d'une infection par *M. genitalium* ou d'autres IST est peut-être plus systématique que dans les territoires ultra-marins. Il pourrait aussi exister une différence de sélection des patients dans les deux populations étudiées. En effet, certains échantillons de la cohorte métropolitaine étaient issus de patients à haut risque de contracter une ou des IST.

Malgré de faibles prévalences rencontrées dans les territoires ultra-marins, les résistances aux macrolides et aux fluoroquinolones de *M. genitalium* restent préoccupantes dans le monde et risquent d'augmenter avec l'utilisation de ces antibiotiques. Une surveillance rapprochée de la résistance est nécessaire et des études sont requises afin de développer de nouvelles thérapeutiques. L'utilisation d'une thérapie guidée par le statut mutationnel de l'échantillon au niveau du gène de l'ARNr 23S décrite par Read *et al.* [39] reste néanmoins une piste prometteuse.

Références

- [1] C. L. McGowin et C. Anderson-Smits, « Mycoplasma genitalium: An Emerging Cause of Sexually Transmitted Disease in Women », *PLoS Pathog*, vol. 7, n° 5, p. e1001324, mai 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1001324.
- [2] « Accueil - CNR des IST bactériennes ». <https://www.cnr-ist.fr/> (consulté le juill. 10, 2020).
- [3] C. Wold, « Identification of macrolide-resistant Mycoplasma genitalium using real-time PCR ». .
- [4] S. Soni *et al.*, « 1 2018 BASHH UK national guideline for the 2 management of infection with Mycoplasma genitalium », p. 27.
- [5] J. F. Braam, L. van Dommelen, C. J. M. Henquet, J. H. B. van de Bovenkamp, et J. G. Kusters, « Multidrug-resistant Mycoplasma genitalium infections in Europe », *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 36, n° 9, p. 1565-1567, sept. 2017, doi: 10.1007/s10096-017-2969-9.
- [6] « Ministère des Solidarités et de la Santé - », *Ministère des Solidarités et de la Santé*. <http://solidarites-sante.gouv.fr/> (consulté le avr. 25, 2020).
- [7] M. A. Blanchard, S. Jarraud, M. J.-L. Koeck, M. F. Thiaucourt, M. M. Dupon, et C. Bébéar, « Analyse du polymorphisme associé aux répétitions en tandem pour le typage de deux espèces de mycoplasmes pathogènes chez l'homme : Mycoplasma genitalium et Mycoplasma pneumoniae », p. 261.
- [8] W. G. Weisburg *et al.*, « A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. », *Journal of Bacteriology*, vol. 171, n° 12, p. 6455-6467, 1989, doi: 10.1128/JB.171.12.6455-6467.1989.
- [9] D. A. Machalek *et al.*, « Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in Mycoplasma genitalium: a systematic review and meta-analysis », *The Lancet Infectious Diseases*, p. S1473309920301547, juill. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30154-7.
- [10] B. Hay, « Prévalence de l'infection à Mycoplasma genitalium et détection de souches résistantes aux macrolides au sein d'une cohorte de femmes sud-africaines - Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ». avr. 29, 1987.
- [11] S. Razin, D. Yagev, et Y. Naot, « Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas », *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, vol. 62, p. 63, 1998.
- [12] S. Sethi, K. Zaman, et N. Jain, « Mycoplasma genitalium infections: current treatment options and resistance issues », *IDR*, vol. Volume 10, p. 283-292, sept. 2017, doi: 10.2147/IDR.S105469.
- [13] C. L. McGowin et P. A. Totten, « The Unique Microbiology and Molecular Pathogenesis of Mycoplasma genitalium », *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 216, n° suppl_2, p. S382-S388, juill. 2017, doi: 10.1093/infdis/jix172.
- [14] C. Cazanave, L. E. Manhart, et C. Bébéar, « Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen », *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 42, n° 9, p. 381-392, sept. 2012, doi: 10.1016/j.medmal.2012.05.006.
- [15] M.-J. Barberá, M. Fernández-Huerta, J.-S. Jensen, E. Caballero, et A. Andreu, « Mycoplasma genitalium Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors Among a 2013–2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain », *Sexually*

- Transmitted Diseases*, vol. 44, n° 8, p. 457-462, août 2017, doi: 10.1097/OLQ.0000000000000631.
- [16] C. S. Bradshaw, J. S. Jensen, et K. B. Waites, « New Horizons in *Mycoplasma genitalium* Treatment », *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 216, n° suppl_2, p. S412-S419, juill. 2017, doi: 10.1093/infdis/jix132.
 - [17] M. C. Fookes *et al.*, « *Mycoplasma genitalium*: whole genome sequence analysis, recombination and population structure », *BMC Genomics*, vol. 18, n° 1, p. 993, déc. 2017, doi: 10.1186/s12864-017-4399-6.
 - [18] J. S. Jensen, M. B. Borre, et B. Dohn, « Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, n° 1, p. 261-266, janv. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.1.261-266.2003.
 - [19] S. N. Tabrizi *et al.*, « Multiplex Assay for Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance Using PlexZyme and PlexPrime Technology », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 6, p. e0156740, juin 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0156740.
 - [20] H. Renaudin, J. G. Tully, et C. Bebear, « In vitro susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* to antibiotics. », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 36, n° 4, p. 870-872, avr. 1992, doi: 10.1128/AAC.36.4.870.
 - [21] C. A. Gaydos, « *Mycoplasma genitalium*: Accurate Diagnosis Is Necessary for Adequate Treatment », *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 216, n° suppl_2, p. S406-S411, juill. 2017, doi: 10.1093/infdis/jix104.
 - [22] E. E. Müller, J. M. E. Venter, M. P. Magooa, C. Morrison, D. A. Lewis, et S. N. Mavedzenge, « Development of a rotor-gene real-time PCR assay for the detection and quantification of *Mycoplasma genitalium* », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 88, n° 2, p. 311-315, févr. 2012, doi: 10.1016/j.mimet.2011.12.017.
 - [23] R. Gnanadurai et H. Fifer, « *Mycoplasma genitalium*: A Review », *Microbiology*, vol. 166, n° 1, p. 21-29, janv. 2020, doi: 10.1099/mic.0.000830.
 - [24] C. L. McGowin, V. L. Popov, et R. B. Pyles, « Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing », *BMC Microbiol*, vol. 9, n° 1, p. 139, 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-139.
 - [25] J. S. Jensen, M. Cusini, M. Gomberg, et H. Moi, « 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections », *J Eur Acad Dermatol Venereol*, vol. 30, n° 10, p. 1650-1656, oct. 2016, doi: 10.1111/jdv.13849.
 - [26] P. Bourée, A. Goubard, J.-M. Bohbot, et I. Alfred-Fournier, « IST à *M. genitalium* : en hausse », p. 1.
 - [27] K. A. Tagg, N. J. Jeoffreys, D. L. Couldwell, J. A. Donald, et G. L. Gilbert, « Fluoroquinolone and Macrolide Resistance-Associated Mutations in *Mycoplasma genitalium* », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, n° 7, p. 2245-2249, juill. 2013, doi: 10.1128/JCM.00495-13.
 - [28] J. S. Jensen, S. A. Uldum, J. Søndergård-Andersen, J. Vuust, et K. Lind, « Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, n° 1, p. 46-50, 1991, doi: 10.1128/JCM.29.1.46-50.1991.
 - [29] J. S. Jensen, E. Bjornelius, B. Dohn, et P. Lidbrink, « Use of TaqMan 5J Nuclease Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in Males with and without Urethritis Who Were Attendees at a Sexually Transmitted Disease Clinic », *J. CLIN. MICROBIOL.*, vol. 42, p. 10, 2004.

- [30] J. S. Jensen, « *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases », p. 11.
- [31] J. Twin *et al.*, « Comparison of Two *Mycoplasma genitalium* Real-Time PCR Detection Methodologies », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, n° 3, p. 1140-1142, mars 2011, doi: 10.1128/JCM.02328-10.
- [32] K. H. Carlsen et J. S. Jensen, « *Mycoplasma genitalium* PCR: Does Freezing of Specimens Affect Sensitivity? », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, n° 10, p. 3624-3627, oct. 2010, doi: 10.1128/JCM.00232-10.
- [33] C. M. Muvunyi *et al.*, « Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens », *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 71, n° 1, p. 29-37, sept. 2011, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.005.
- [34] A. Touati, O. Peuchant, J. S. Jensen, C. Bebear, et S. Pereyre, « Direct Detection of Macrolide Resistance in *Mycoplasma genitalium* Isolates from Clinical Specimens from France by Use of Real-Time PCR and Melting Curve Analysis », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, n° 5, p. 1549-1555, mai 2014, doi: 10.1128/JCM.03318-13.
- [35] D. Lewis et D. Couldwell, « *Mycoplasma genitalium* infection: current treatment options, therapeutic failure, and resistance-associated mutations », *IDR*, p. 147, mai 2015, doi: 10.2147/IDR.S48813.
- [36] R. Hamasuna *et al.*, « Mutations in ParC and GyrA of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains », *PLoS ONE*, vol. 13, n° 6, p. e0198355, juin 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0198355.
- [37] J. S. Jensen, C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley, et R. Hamasuna, « Azithromycin Treatment Failure in *Mycoplasma genitalium* –Positive Patients with Nongonococcal Urethritis Is Associated with Induced Macrolide Resistance », *CLIN INFECT DIS*, vol. 47, n° 12, p. 1546-1553, déc. 2008, doi: 10.1086/593188.
- [38] M. Bissessor *et al.*, « Macrolide Resistance and Azithromycin Failure in a *Mycoplasma genitalium*-Infected Cohort and Response of Azithromycin Failures to Alternative Antibiotic Regimens », *Clinical Infectious Diseases*, vol. 60, n° 8, p. 1228-1236, avr. 2015, doi: 10.1093/cid/ciu1162.
- [39] T. R. H. Read *et al.*, « Outcomes of Resistance-guided Sequential Treatment of *Mycoplasma genitalium* Infections: A Prospective Evaluation », *Clinical Infectious Diseases*, vol. 68, n° 4, p. 554-560, févr. 2019, doi: 10.1093/cid/ciy477.
- [40] G. L. Murray *et al.*, « Increasing Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, n° 5, p. 809-812, mai 2017, doi: 10.3201/eid2305.161745.
- [41] J. Twin *et al.*, « Transmission and Selection of Macrolide Resistant *Mycoplasma genitalium* Infections Detected by Rapid High Resolution Melt Analysis », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 4, p. e35593, avr. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035593.
- [42] S. Soni *et al.*, « British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Mycoplasma genitalium* (2018) », *Int J STD AIDS*, vol. 30, n° 10, p. 938-950, sept. 2019, doi: 10.1177/0956462419825948.
- [43] C. M. Fraser *et al.*, « The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium* », *Science*, vol. 270, n° 5235, p. 397-403, oct. 1995, doi: 10.1126/science.270.5235.397.
- [44] SpeedX, australia, « ResistancePlus-MG_IF-IV0003-v9_French.pdf ». nov. 2019.
- [45] « Mix PCR Biovalley ». <https://www.biovalley.fr/achat/cat-mix-pcr-3479.html?page=2> (consulté le juill. 11, 2020).

- [46] Le Roy *et al.*, « Fluoroquinolone-Resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France ». .
- [47] Y. Shimada *et al.*, « Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance », *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 36, n° 3, p. 255-258, sept. 2010, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.05.011.
- [48] « Rapport annuel d'activité 2018. CNR des IST bactériennes. »

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. »