



HAL
open science

Mycoplasma genitalium : prévalence et résistance aux macrolides et fluoroquinolones au sein de la cohorte Chlazidoxy

Alexandre Ferron

► **To cite this version:**

Alexandre Ferron. Mycoplasma genitalium : prévalence et résistance aux macrolides et fluoroquinolones au sein de la cohorte Chlazidoxy. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-04254188

HAL Id: dumas-04254188

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04254188>

Submitted on 23 Oct 2023

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 2021

Thèse n°120

THÈSE POUR L'OBTENTION DU
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Alexandre FERRON

Né le 02/11/1993 à Laval (53)

Le 14/10/2021

***MYCOPLASMA GENITALIUM* :**
PRÉVALENCE ET RÉSISTANCE
AUX MACROLIDES ET FLUOROQUINOLONES
AU SEIN DE LA COHORTE CHLAZIDOXY

Sous la direction du Dr Olivia PEUCHANT

Membres du jury :	Mme Véronique DUBOIS, Professeur	Président
	Mme Cécile BEBEAR, Professeur	Juge
	Mme Olivia PEUCHANT, Docteur	Directeur
	Mme Isabelle LE HEN, Docteur	Juge

REMERCIEMENTS

À Madame Olivia Peuchant, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour ta bienveillance et pour tes précieux conseils qui m'ont permis d'avancer sereinement.

À Madame Véronique Dubois, c'est un honneur que vous me faites de présider cette thèse. Veuillez recevoir le témoignage de ma respectueuse considération.

À Madame Cécile Bébéar, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie du jury. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À Madame Isabelle Le Hen, je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de vous prononcer sur l'intérêt de ce travail. Recevez ma sincère gratitude.

À Chloé Le Roy, un grand merci pour ton accueil chaleureux au sein du laboratoire et pour ton implication tout au long de ce travail. Tes explications et tes conseils m'ont beaucoup apporté.

À ma famille,

À mes parents, merci pour votre soutien et votre bienveillance depuis toujours, on a fait un sacré bout de chemin depuis Saint-Aubin. Le meilleur est à venir !

À mon frère, merci pour ta bonne humeur à toute épreuve, bon voyage en Chine, revenez nombreux ! ☺

À ma sœur, merci pour ta joie de vivre et ta gentillesse, future pharmacienne de renom ! Bon courage pour ton internat !

À Candice, merci d'être là depuis un petit moment déjà, merci pour tout ce bonheur que tu m'apportes au quotidien. Bon courage pour ta thèse, chacun son tour !

À mes amis et à mes co-internes.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	5
TABLE DES FIGURES.....	6
TABLE DES TABLEAUX.....	7
INTRODUCTION	8
A. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR <i>MYCOPLASMA GENITALIUM</i>	8
<i>I. Caractéristiques générales.....</i>	8
<i>II. Épidémiologie.....</i>	11
1. Mode de transmission et facteurs de risque	11
2. Prévalence.....	11
<i>III. Pouvoir pathogène.....</i>	13
1. Chez la femme.....	13
2. Chez l'homme	13
<i>IV. Diagnostic biologique.....</i>	14
1. Échantillons.....	14
2. Techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN)	14
<i>V. Sensibilité aux antibiotiques.....</i>	16
1. Résistances naturelles.....	16
2. Antibiotiques actifs	16
3. Résistances acquises	18
4. Recommandations thérapeutiques.....	25
B. COHORTE CHLAZIDOXY.....	27
OBJECTIFS.....	29

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	30
I. <i>Échantillons cliniques de la cohorte Chlazidoxy</i>	30
II. <i>Détection et quantification de M. genitalium par PCR en temps réel</i>	30
1. Extraction de l'ADN	30
2. PCR en temps réel	31
III. <i>Détection de la résistance aux macrolides</i>	35
1. PCR en temps réel de type FRET	35
2. Séquençage de l'ARNr 23S	40
IV. <i>Détection de la résistance aux fluoroquinolones</i>	41
1. PCR en point final	41
2. Séquençage	43
RÉSULTATS.....	44
I. <i>Prévalence de l'infection à M. genitalium au sein de la cohorte Chlazidoxy</i>	44
II. <i>Données démographiques et clinico-biologiques</i>	47
III. <i>Charge bactérienne</i>	50
IV. <i>Prévalence de la résistance aux macrolides</i>	52
V. <i>Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones</i>	54
1. Recherche de mutations au sein du gène <i>parC</i>	54
2. Recherche de mutation au sein du gène <i>gyrA</i>	55
DISCUSSION.....	57
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	60
SERMENT DE GALIEN	66

TABLE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

CeGIDD : Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des infections par le VIH, les hépatites virales et les IST

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

Ct : Cycle Treshold, cycle de seuil

DOM-TOM : Départements d'Outre-Mer et Territoires d'Outre-Mer

ECG : Électrocardiogramme

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

GRIDIST : Groupe Infectiologie Dermatologique et Infections Sexuellement Transmissibles

HSH : Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes

Ile : Isoleucine

IST : Infection Sexuellement Transmissible

IVG : Interruption Volontaire de Grossesse

kb : kilobase

MgPa : *Mycoplasma genitalium* Attachment Protein

ND : Non Déterminé

NYHA : New York Heart Association

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

QRDR : Quinolone Resistance Determining Regions

Ser : Sérine

TAAN : Techniques d'Amplification des Acides Nucléiques

TOC : Test Of Cure, test de vérification microbiologique de guérison

UNG : Urétrite non-gonococcique

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WT : Wild Type, souche sauvage

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des Mollicutes construit à partir des séquences d'ARNr 16S selon la méthode des distances.

Figure 2 : *Mycoplasma genitalium* observé au microscope électronique.

Figure 3 : Classification des macrolides et des kétolides.

Figure 4 : Structure secondaire de l'ARNr 23S.

Figure 5 : Prévalence des mutations A2058 et A2059 associées à la résistance aux macrolides chez *M. genitalium*.

Figure 6 : Prévalence des mutations Ser83Arg, Ser83Ile, Asp87Asn et Asp87Tyr au sein de la protéine ParC associées à la résistance aux fluoroquinolones chez *M. genitalium*.

Figure 7 : Prévalence de *M. genitalium* résistant aux macrolides et aux fluoroquinolones.

Figure 8 : Exemple de PCR en temps réel.

Figure 9 : Principe de la PCR TaqMan.

Figure 10 : Courbe d'étalonnage pour la quantification de *M. genitalium*.

Figure 11 : Principe des sondes d'hybridation.

Figure 12 : Courbes de dissociation obtenues en fonction de l'appariement parfait ou non entre la sonde de détection et la séquence cible.

Figure 13 : Profil des courbes de fusion en fonction des mutations de l'ARNr 23S chez *M. genitalium*.

Figure 14 : Photographie d'une électrophorèse sur gel d'agarose révélée sous rayons UV.

Figure 15 : Nombre d'échantillons vaginaux et ano-rectaux négatifs et positifs à *M. genitalium*.

Figure 16 : Charge bactérienne de *M. genitalium* selon le site de prélèvement.

Figure 17 : Résultats de la recherche de mutations associées à la résistance aux macrolides au sein des échantillons positifs à *M. genitalium*.

Figure 18 : Résultats de la recherche de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones dans le gène *parC* au sein des échantillons positifs à *M. genitalium*.

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Kits actuellement commercialisés pour la détection moléculaire de *M. genitalium*.

Tableau 2 : Kits actuellement commercialisés pour la détection de *M. genitalium* et des mutations de résistance aux macrolides.

Tableau 3 : Amorces et sonde utilisées pour la PCR TaqMan de quantification de *M. genitalium*.

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR TaqMan de quantification de *M. genitalium*.

Tableau 5 : Amorces et sondes utilisées pour la PCR de type FRET pour la détection des mutations de l'ARNr 23S.

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR de type FRET.

Tableau 7 : Programme de la PCR de type FRET.

Tableau 8 : Amorces utilisées pour l'amplification des QRDR *gyrA* et *parC*.

Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR en point final.

Tableau 10 : Programme de la PCR en point final.

Tableau 11 : Patientes ayant une infection vaginale et/ou ano-rectale à *M. genitalium* au sein de la cohorte Chlazidoxy.

Tableau 12 : Prévalence de l'infection à *M. genitalium* par centre.

Tableau 13 : Données démographiques des patients positives et négatives à *M. genitalium*.

Tableau 14 : Données clinico-biologiques des patientes positives et négatives à *M. genitalium*.

Tableau 15 : Charge bactérienne chez les patientes ayant une PCR *M. genitalium* positive.

Tableau 16 : Mutations de résistance identifiées au sein de l'ARNr 23S.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des mutations de résistance identifiées au sein de la protéine ParC.

INTRODUCTION

A. Étude bibliographique sur *Mycoplasma genitalium*

L'arbre phylogénétique de *Mycoplasma 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) [1]. Mollicutes vient du latin « mollis » et « cutis » qui signifient respectivement « mou » et « peau ». Les Mollicutes ne possèdent pas de paroi. Le genre le plus connu des Mollicutes est *Mycoplasma* mais nous retrouvons également le genre *Ureaplasma*. Ces deux genres regroupent certaines bactéries pathogènes pour l'Homme surtout au niveau des voies respiratoires et urogénitales. Le genre *Mycoplasma* regroupe plus de 100 espèces parmi lesquelles 16 sont d'origine humaine, dont *M. genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum*.

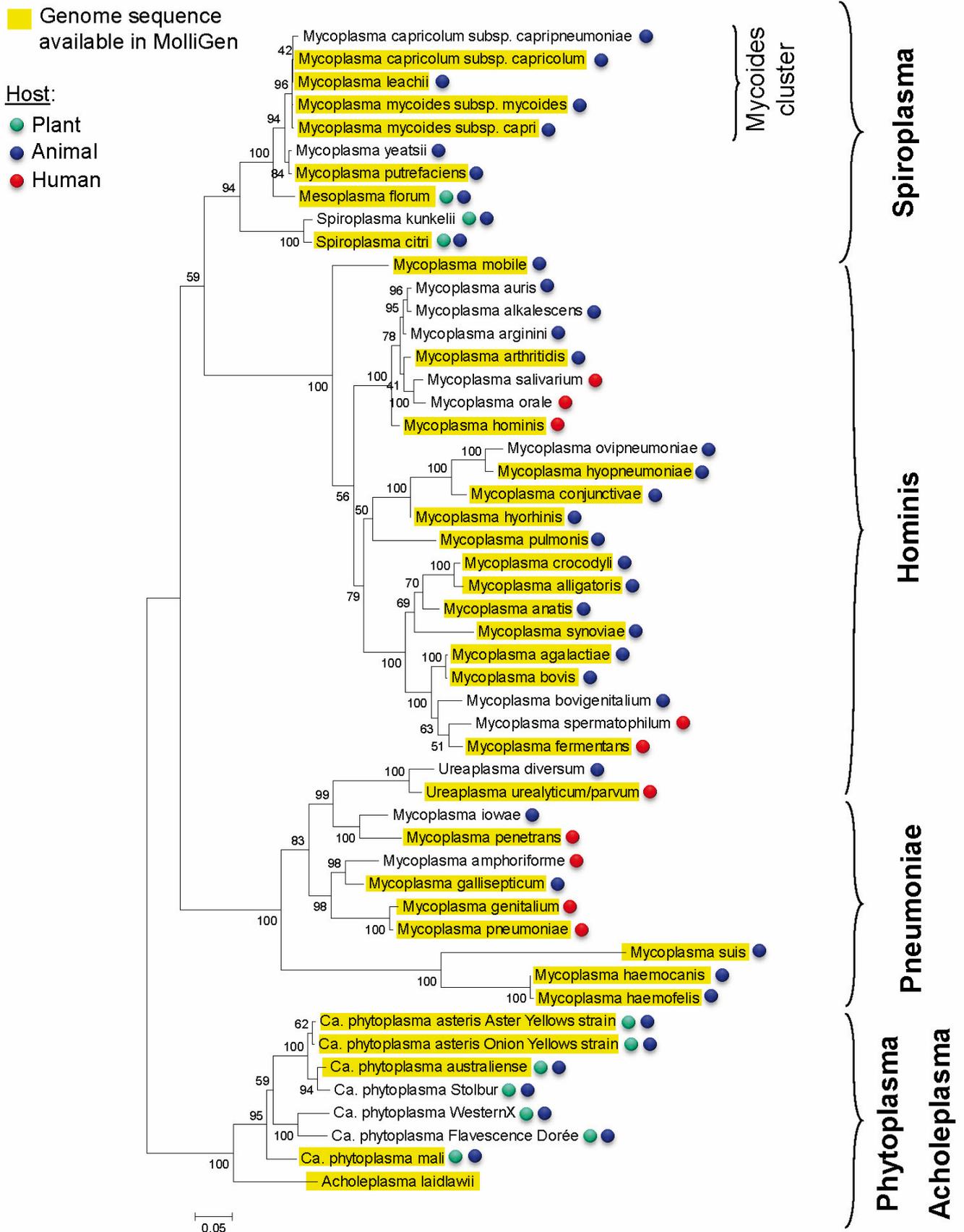
Selon leur site primaire d'isolement, ces mycoplasmes peuvent être séparés en espèces d'origine respiratoire et génitale :

- *M. pneumoniae* est responsable d'infections respiratoires.
- *M. genitalium*, *M. hominis* et *Ureaplasma spp.* sont retrouvés au niveau de la sphère génitale. Seul *M. genitalium* est un agent responsable d'infection sexuellement transmissible (IST).

I. Caractéristiques générales

M. genitalium a été isolé pour la première fois en 1980 [2]. C'est le plus petit organisme procaryote capable d'auto-réplication. Avec une taille d'environ 580 kb, le génome de la souche de référence *M. genitalium* G37 a été le second génome bactérien complètement séquencé [3]. À titre de comparaison, le génome de *M. pneumoniae* est composé de 816 kb, tandis que *Chlamydia trachomatis* et *Escherichia coli* possèdent respectivement 1450 kb et 4700 kb.

Les mycoplasmes ont initialement développé un mode de vie parasitaire en obtenant de la part de leur hôte les nutriments qu'ils ne pouvaient pas synthétiser eux-mêmes. *M. genitalium* est capable de métaboliser le glucose mais pas l'arginine, ni l'urée. Du fait de son exigence en stéroïdes, c'est une bactérie à croissance très lente en culture à 37°C, en anaérobiose sous 5% de CO₂ [4].



Phylogenetic tree inferred from 16S rDNA sequences – Maximum Likelihood

Figure 1 : Arbre phylogénétique des Mollicutes construit à partir des séquences d'ARNr 16S selon la méthode des distances (d'après le site MolliGen 3.0).

En microscopie électronique, *M. genitalium* se présente sous forme de bouteille et mesure environ 0,6 - 0,7 μm x 0,3 - 0,4 μm . Il dispose d'un organite au niveau de l'extrémité terminale appelé organelle d'attachement (ou « tip ») lui permettant ainsi d'adhérer aux cellules épithéliales du tractus génital (Figure 2) [5]. Cet organelle d'attachement joue un rôle majeur dans sa pathogénicité puisqu'il lui permet d'adhérer à différentes surfaces telles que le plastique et le verre *in vitro*, mais également aux cellules épithéliales humaines et animales *in vivo* [6]. Pour ce faire, deux protéines principales sont nécessaires :

- La protéine MgpB (aussi appelée MgPa ou P140) = *M. genitalium* attachment protein ; 140 kDa.
- La protéine MgpC (aussi appelée P110).

Malgré sa petite taille, 4% du génome de *M. genitalium* est constitué d'éléments répétés appelés MgPar, pour « MgPa repeats ». La découverte de séquences homologues à ces MgPar au sein des gènes *mgpB* et *mgpC* suggère que des variations antigéniques dans les protéines de surface MgpB et MgpC peuvent survenir [5]. Ceci permettrait à *M. genitalium* d'échapper au système immunitaire et de persister dans son environnement [7].



Figure 2 : *Mycoplasma genitalium* observé au microscope électronique [6].

Malgré un génome de taille limitée, *M. genitalium* possède le matériel génétique suffisant pour acquérir une mobilité active avec une vitesse d'environ 0,1 μm par seconde [6].

II. Épidémiologie

1. Mode de transmission et facteurs de risque

M. genitalium est une bactérie responsable d'IST. Il se transmet par voie sexuelle, par contact direct entre les muqueuses génitales entre elles, ou entre les muqueuses génitales et anales. Des études épidémiologiques, incluant entre autres le dépistage des partenaires sexuels, ont effectivement démontré une transmission par voie sexuelle de *M. genitalium* avec une concordance des génotypes retrouvés au sein des couples infectés [8].

Une méta-analyse récente évaluant l'infection à *M. genitalium* chez les couples a montré que 39 à 50% des partenaires sexuels masculins ou féminins des participants infectés avaient également une infection à *M. genitalium* [9].

D'après la Haute Autorité de Santé, le terme de population à risque d'IST regroupe :

- le multipartenariat (au moins deux partenaires dans l'année).
- un changement de partenaire récent.
- les individus ou partenaires diagnostiqués avec une autre IST (*Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, VIH, *C. trachomatis*) ou ayant des antécédents d'IST.
- les Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes (HSH).
- les personnes en situation de prostitution, ou après un viol.

2. Prévalence

Population générale

En France, une étude multicentrique réalisée entre 2014 et 2015 a trouvé une prévalence de *M. genitalium* de 3,4% (IC 95%, 2,8 – 4,2), sans différence significative selon le sexe ou l'âge (sauf entre les hommes et les femmes de 35 à 44 ans) ; dans 80% des cas, il s'agissait d'infections asymptomatiques [10]. La prévalence de l'infection à *M. genitalium* était significativement plus élevée chez les patients positifs à *C. trachomatis* que chez les patients négatifs à *C. trachomatis* (respectivement 7,7% versus 2,9%). Elle était également trois fois plus élevée chez les patients positifs à *N. gonorrhoeae* que chez les patients négatifs à *N. gonorrhoeae* (respectivement 10,1% versus 3,3%).

Une méta-analyse reprenant les données publiées entre 1991 et 2016 trouvait une prévalence de *M. genitalium* de 1,3% dans les pays développés, et de 3,9% dans les pays émergents [11]. La prévalence était similaire entre les hommes et les femmes.

Au sein de sous-populations spécifiques, les estimations de prévalence étaient les suivantes :

- femmes enceintes : 0,9% (0,6 à 1,4%).
- HSH : 3,2% (2,1 à 5,1%).
- travailleuses du sexe : 15,6% (13,2 à 26,3%).

Par rapport à *C. trachomatis*, la prévalence des patients infectés par *M. genitalium* semble atteindre un pic environ cinq ans plus tard, tant chez les hommes que chez les femmes, et reste plus importante dans les groupes d'âge plus élevés [11][12].

HSH

Une récente méta-analyse a montré une prévalence de *M. genitalium* de 5% (IC 95%, 3,5 - 6,8) au niveau urétral, 6,2% (IC 95%, 4,6 - 8,1) au niveau rectal et 1% (IC 95%, 0 - 5,1) au niveau pharyngé [13]. La prévalence de *M. genitalium* était significativement plus élevée au niveau de l'urètre et du rectum chez les patients symptomatiques que chez les patients asymptomatiques (respectivement 7,1% versus 2,2%, $p < 0,001$; et 16,1% versus 7,5%, $p = 0,039$).

VIH

Une méta-analyse portant sur l'association entre les infections à *M. genitalium* et le VIH a été publiée en 2009 [14]. Dix-neuf études ont été identifiées et analysées. La prévalence de *M. genitalium* variait de 3,1% à 47,5%. Dans 17 études, les patients infectés par *M. genitalium* étaient plus susceptibles d'être infectés par le VIH et cette association était statistiquement significative dans 12 études avec un odds ratio (OR) résumé de 2,01 (IC 95%, 1,44-2,79).

Les patients infectés par le VIH avaient une prévalence plus élevée d'infection à *M. genitalium*, aussi bien chez les HSH [13] que chez les femmes [15].

De plus, il a été montré que l'excrétion du VIH était plus fréquente chez les personnes séropositives pour le VIH qui ne prenaient pas de traitement antirétroviral et infectées par *M. genitalium*, que chez les personnes non infectées par *M. genitalium* [16].

Chez les femmes, l'infection à *M. genitalium* majorerait le risque de transmission du VIH en augmentant la charge virale dans les sécrétions vaginales [7].

Femmes

La prévalence de *M. genitalium* chez les femmes dans la population générale varie de 1 à 6,4% [7]. Celle-ci augmente de 4 à 38% dans les populations à risque d'IST [7][17].

Prélèvements rectaux

Au sein d'échantillons ano-rectaux, la prévalence de *M. genitalium* est fluctuante en fonction du type de population étudiée. Elle varie de 6,2% chez des HSH [13], à 3-8% chez des femmes sans facteurs de risque [18], à 2,7-22% chez des femmes issues de population à risque [19][20].

Les co-infections *C. trachomatis*/*M. genitalium* sont fréquentes, en particulier chez les populations à risque [21]. Néanmoins, la charge bactérienne de *M. genitalium* est généralement 100 fois plus faible que celle de *C. trachomatis* [7].

III. Pouvoir pathogène

1. Chez la femme

M. genitalium peut être responsable de cervicite ou d'urétrite occasionnant des signes fonctionnels urinaires, des métrorragies et/ou des leucorrhées [6][22]. Il peut également être responsable d'infection génitale haute (endométrite, salpingite). Ces infections pourraient avoir des conséquences obstétricales, dont la preuve n'est pas encore établie : infertilité tubaire, grossesse extra-utérine, accouchement prématuré [7].

2. Chez l'homme

M. genitalium est responsable d'urétrite aiguë ou chronique (« urétrite non gonococcique », UNG) [6][22]. C'est le deuxième agent responsable d'UNG après *C. trachomatis*. Il peut également être à l'origine de balanoposthite et d'épididymite aiguë. Des cas d'ano-rectites et de prostatites ont été décrits. Dans les deux sexes, des arthrites réactionnelles ont également été rapportées [23].

En cas d'infection symptomatique, il a été constaté que la charge bactérienne est significativement plus importante que chez un patient asymptomatique [24].

IV. Diagnostic biologique

Le diagnostic bactériologique est uniquement direct par l'utilisation de techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN), la culture étant extrêmement fastidieuse et non réalisée en routine. Il n'existe pas de trousse sérologique pour cette espèce de mycoplasme.

Qui dépister ?

Selon le communiqué de 2018 de la Société Européenne de Dermatologie et Vénérologie du GRIDIST (Groupe Infectiologie Dermatologique et Infections Sexuellement Transmissibles) et du CNR des IST bactériennes, il est recommandé de limiter le dépistage aux patients symptomatiques (urétrite, cervicite, infection génitale haute, ano-rectite) et de ne pas traiter les patients asymptomatiques. Un test de contrôle de guérison quatre à cinq semaines après le début du traitement est préconisé.

1. Échantillons

Chez l'homme symptomatique, le prélèvement de choix est le premier jet d'urines, plus sensible qu'un prélèvement urétral [25].

Chez la femme symptomatique, dans l'infection génitale basse, un prélèvement endocervical sous spéculum ou un (auto-)prélèvement vaginal doit être réalisé. Il est également possible d'effectuer des prélèvements profonds (par coelioscopie ou radioguidés) en cas d'infection génitale haute [25][26][27].

En cas de rectite, un prélèvement ano-rectal peut être réalisé, après avoir éliminé les autres étiologies possibles.

En cas d'arthrite, une ponction de liquide articulaire doit être effectuée.

2. Techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN)

À l'heure actuelle, les TAAN en temps réel sont utilisées pour la détection de *M. genitalium*. Les premières techniques développées étaient des PCR dites « maison », basées sur l'amplification du gène *mgpB* ou de l'ARNr 16S le plus fréquemment.

De nombreux kits sont commercialisés pour la détection de *M. genitalium*, seul ou associé à d'autres agents d'IST (multiplex).

Tableau 1 : Kits actuellement commercialisés pour la détection moléculaire de *M. genitalium*.

Kit	Pathogènes détectés	Cible du gène de <i>M. genitalium</i>	Échantillons
S-DiaMGTV (Diagenode)	MG, TV	MG : gènes <i>mgpB</i> et <i>mg219</i>	- Prélèvement urinaire - Échantillon urogénital
Seeplex STD6 ACE (Seegene)	CT, NG, MG, TV, MH <i>Ureaplasma sp.</i> ,	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon urétral, cervico-vaginal
Aptima MG Assay (Hologic)	MG	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon urétral, cervico-vaginal
Cobas 6800 (Roche)	MG, TV	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon urétral, cervico-vaginal
Alinity (Abbott)	CT, NG, MG, TV	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon cervico-vaginal
Real-TM (Sacace Biotechnologies)	CT, NG, MG, TV	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon cervical, urétral, conjonctival - Liquide prostatique, sperme
STI PLUS ELITe MGB (ELITechGroup)	CT, NG, MG, TV	- NG : gène <i>pivNG</i> - CT : gènes <i>dnaB</i> et <i>ompA</i> - MG : ARN 23S - TV : séquence répétée L23861	- Prélèvement urinaire - Écouvillon cervico-vaginal
Allplex STI Essential (Seegene)	CT, NG, MG, TV Uu, Up, MH	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon vaginal
FTD Urethritis Plus (Fast Track Diagnostics)	CT, NG, MG, TV, Uu, Up, MH	-	- Prélèvement urinaire - Écouvillon génital, rectal

CT, *C. trachomatis*; NG, *N. gonorrhoeae*; MG, *M. genitalium*; TV, *Trichomonas vaginalis*;
Uu, *Ureaplasma urealyticum*; Up, *Ureaplasma parvum*; MH, *Mycoplasma hominis*.

V. Sensibilité aux antibiotiques

En routine, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *M. genitalium* n'est pas réalisée du fait de sa culture fastidieuse [28].

1. Résistances naturelles

De par leur absence de paroi, tous les organismes de la classe des Mollicutes résistent aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi comme les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine [29]. Ils résistent en outre aux polymyxines, sulfamides, triméthoprime, à l'acide nalidixique et à la rifampicine.

2. Antibiotiques actifs

Les antibiotiques potentiellement actifs sur *M. genitalium* et utilisés en thérapeutique sont les molécules du groupe MLSK (Macrolides – Lincosamides – Streptogramines – Kétolides), les fluoroquinolones et les tétracyclines.

a. Macrolides et apparentés

Les macrolides sont des molécules hydrophobes possédant au moins deux sucres aminés ou neutres attachés à un grand noyau lactonique de taille différente selon le produit. Il existe une classification qui prend en compte le nombre de chaînons de la structure lactonique et l'origine naturelle ou héli-synthétique de la molécule. Les macrolides utilisés en thérapeutique ont un noyau à 14 chaînons, 15 chaînons ou 16 chaînons (Figure 3). L'antibiotique de choix pour le traitement des infections à *M. genitalium* est l'azithromycine. C'est un macrolide semi-synthétique à 15 chaînons dont le mécanisme d'action est le suivant : il se fixe au niveau de l'ARNr 23S sur la sous-unité 50S du ribosome, ce qui entraîne une inhibition de la translocation, étape clef de la traduction de l'ARNm (ARN messenger) en protéine bactérienne. Cela aboutit à une dissociation prématurée du polypeptide en cours de croissance et donc une inhibition de la synthèse protéique. Il s'agit d'un antibiotique bactériostatique [30].

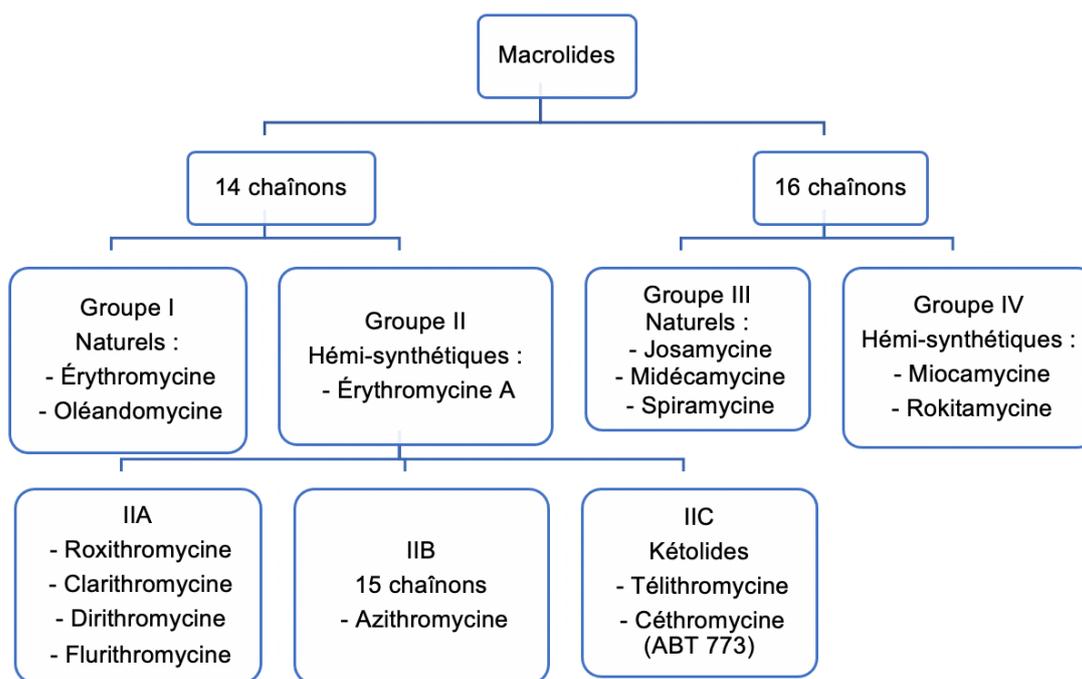


Figure 3 : Classification des macrolides et des kétolides.

Les streptogramines (ou synergistines) sont constituées d'un mélange d'au moins deux composés appartenant à deux groupes de molécules qui agissent en synergie sur le plan microbiologique : les streptogramines A (pristinamycine IA, dalfopristine et virginiamycine M) et les streptogramines B (pristinamycine IIA, quinupristine et virginiamycine S). Les apparentés aux macrolides peuvent également être utilisés dans certaines indications, notamment la pristinamycine (famille des streptogramines). Celle-ci est composée de deux molécules : la pristinamycine IA et la pristinamycine IIA, qui ont une activité bactéricide de par leur synergie. En effet, lors de la liaison de la pristinamycine IIA à la sous-unité ribosomique 50S, le ribosome change de conformation ce qui améliore la fixation de la pristinamycine IA : celle-ci bloque alors la synthèse protéique de manière irréversible [30].

b. Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones exercent une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse qui sont des ADN topoisomérases de type II :

- l'ADN gyrase codée par les gènes *gyrA* et *gyrB*.
- la topoisomérase IV codée par les gènes *parC* et *parE*.

Les fluoroquinolones agissent en inhibant ces deux enzymes bactériennes, entraînant une inhibition de la réplication bactérienne et à terme une bactéricidie [31].

La molécule de choix dans le traitement des infections à *M. genitalium* est la moxifloxacin, il s'agit d'une fluoroquinolone de 4^{ème} génération.

c. Tétracyclines

Les tétracyclines sont des inhibiteurs de la phase d'élongation de la synthèse protéique. Elles se fixent sur l'ARNr 16S au niveau de la sous-unité 30S, ce qui va inhiber la fixation du complexe aa-ARNt sur le site A du ribosome lors de la phase d'élongation et entraîner une inhibition de la synthèse protéique. Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques.

La principale molécule utilisée dans le traitement des infections à *M. genitalium* est la doxycycline.

3. Résistances acquises

Parmi les mécanismes de résistance acquise, seules les altérations de la cible ont été décrites chez *M. genitalium*. Le support génétique de la résistance correspond à des mutations qui concernent notamment la classe des MLSK et des fluoroquinolones.

a. Résistances acquises aux macrolides

Mécanisme de résistance

La résistance aux macrolides est liée à la présence de mutations de la cible ribosomique, au niveau de la boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S (Figure 4). Les mutations en position 2058 et 2059 (système de numérotation *E. coli*), connues comme des « hot spots » de résistance aux macrolides chez les autres bactéries, sont les plus fréquemment rencontrées.

Il s'agit principalement des mutations A2059G et A2058G, A2058C, A2058T et A2059C [32]. Ces mutations entraînent une résistance de haut niveau à l'azithromycine [28].

Les mutations A2062C et A2062T peuvent conférer une résistance aux macrolides à 16 chaînons comme la josamycine [32], avec cependant une sensibilité aux macrolides à 15 chaînons conservée pour la mutation A2062T [17].

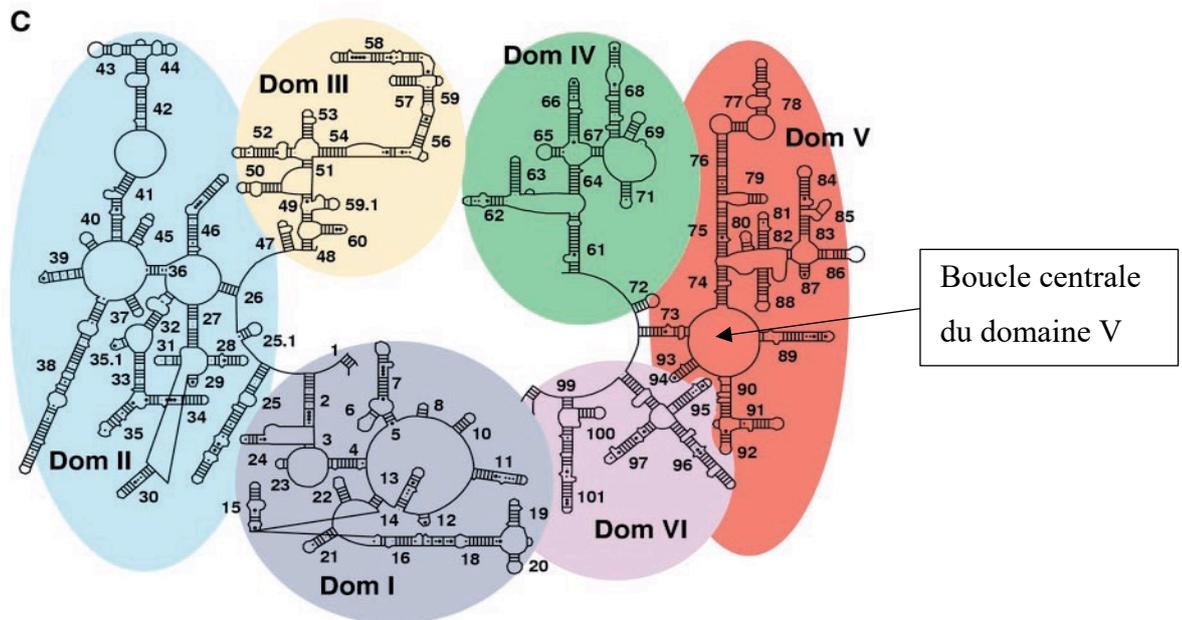


Figure 4 : Structure secondaire de l'ARNr 23S [33].

Prévalence

L'augmentation du nombre de souches de *M. genitalium* résistantes aux macrolides est corrélée au traitement par azithromycine 1 g en monodose prescrit de manière intensive sans effectuer de recherche de résistance au préalable.

- En France :

La première étude réalisée en 2012 rapportait une prévalence de résistance de 10% en 2006, 13,3% en 2007, 15,4% en 2008, 14,3% en 2009 et 12,8% en 2010 [34]. Les deux années suivantes, cette prévalence est restée stable, avec 14,5% en 2011 et 13,8% en 2012 [35]. Les données du CNR des IST bactériennes montrent une forte augmentation avec des taux de résistance aux macrolides de 33,13% en 2018, 34,76% en 2019 et 36,36% en 2020 (rapport CNR des IST bactériennes 2021).

- Dans le monde :

Une récente méta-analyse rassemblant les données de *M. genitalium* porteur de mutations au niveau des nucléotides A2058 et A2059 a montré une prévalence globale de résistance aux macrolides de 35,5% (IC 95%, 28,8 - 42) (Figure 5) [28]. Une augmentation significative de la résistance a été observée avec les années, la prévalence passant de 10% (IC 95%, 2,6 - 20,1) en 2010 à 51,4% (IC 95%, 40,3 – 62,4) en 2016-2017. L'Australie (de 18,8% [10,4 – 25,6%] avant 2010, à 66,0% [59,5 – 72,2%] en 2016-2017) et le Japon (de 1,2% [0,0 – 5,4%] à 69,3% [63,1 – 75,1%]) ont observé les plus fortes augmentations de prévalence de résistance.

En Europe, il n'a pas été mis en évidence de changement de manière significative au fil du temps. Dans les pays nordiques, la prévalence globale était la plus élevée en Norvège (56% [49,3 – 62,6%]) et la plus faible en Suède (13,9% [10,4 – 17,8%]) [28]. Dans le reste de la région européenne, nous avons retrouvé une prévalence de résistance élevée au Royaume-Uni (74,3% [64,9 – 82,8%]) et beaucoup plus basse en Russie (3,7% [2,3 – 5,2%]), mais ces données reposaient sur un faible nombre d'études.

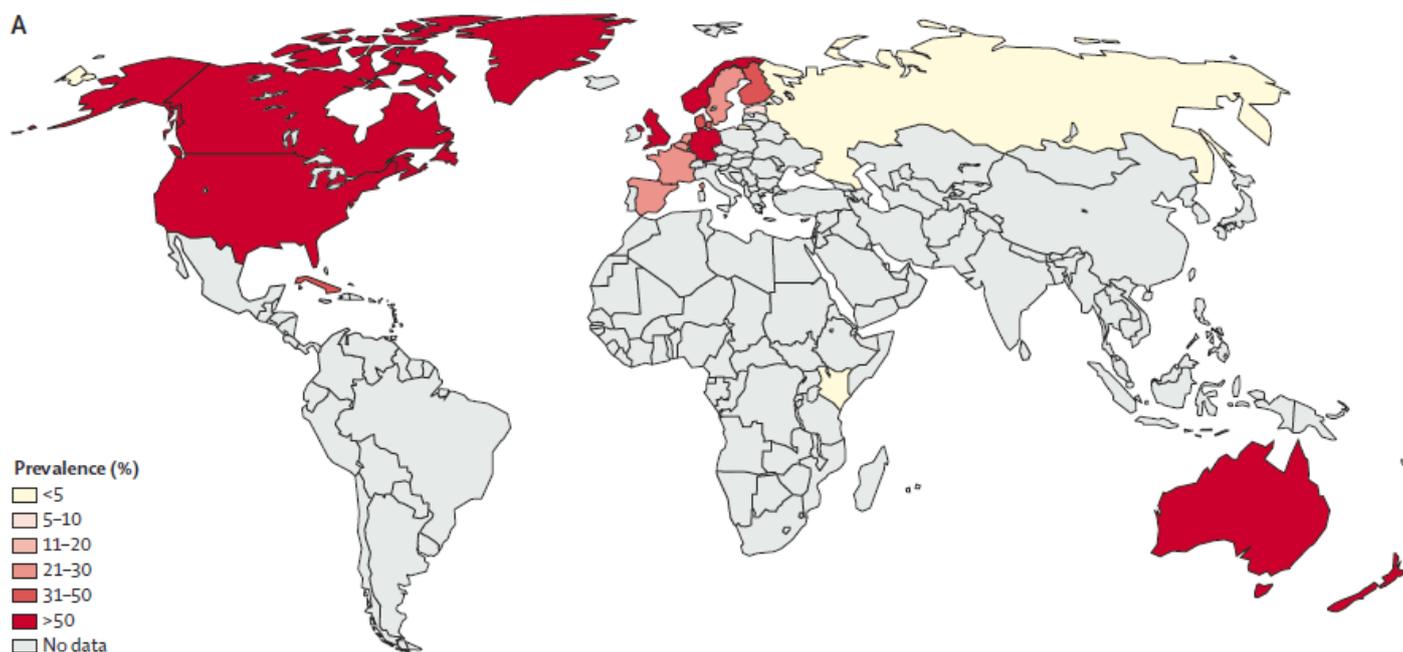


Figure 5 : Prévalence des mutations A2058 et A2059 associées à la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* [28].

Détection de la résistance dans les échantillons cliniques

Face à la prévalence importante de résistance aux macrolides chez *M. genitalium*, il est désormais recommandé de rechercher ces mutations avant d'initier un traitement.

Ceci est réalisé directement à partir de l'échantillon clinique. Il s'agit de techniques d'amplification de l'ARNr 23S suivies d'un séquençage [34] ou de techniques de PCR en temps réel de type FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) suivies de l'analyse de courbes de fusion développée au laboratoire [35]. C'est cette technique que nous utiliserons dans notre travail et que nous détaillerons dans le chapitre « Matériels et méthodes » de ce manuscrit.

Des kits commercialisés, permettant la détection simultanée de *M. genitalium* et de la présence des mutations les plus fréquemment associées à la résistance aux macrolides, sont également disponibles (Tableau 2) [36][37].

Tableau 2 : Kits actuellement commercialisés pour la détection de *M. genitalium* et des mutations de résistance aux macrolides.

Kit	Mutations détectées
SpeedX ResistancePlus MG Flexible (Cepheid)	A2058G, A2058T, A2058C A2059G
S-DiaMGRes (Diagenode)	Mutations en position 2058 et 2059
Macrolide – R/MG ELITe MGB (ELITechGroup)	A2058G, A2058T, A2058C A2059G, A20259C

b. Résistances acquises aux fluoroquinolones

Mécanismes de résistance

La résistance aux fluoroquinolones est liée essentiellement à des mutations chromosomiques au niveau des gènes *gyrA* et *gyrB* codant l'ADN gyrase et des gènes *parC* et *parE* codant la topoisomérase IV. Les mutations sont retrouvées au niveau de régions conservées de ces gènes appelées les QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions).

Les gènes *gyrA* et *parC* sont les cibles préférentielles des fluoroquinolones, c'est pourquoi ils ont un rôle très important dans la résistance acquise. Les mutations des QRDR *gyrA* et *parC* sont responsables d'une mauvaise affinité des topoisomérases pour la fluoroquinolone. Cependant, chez *M. genitalium*, les mutations au niveau du gène *gyrA* n'ont pas été associées à une résistance aux fluoroquinolones [31][38].

À ce jour, cinq mutations localisées dans la QRDR de la protéine ParC sont décrites dans la littérature comme associées à la résistance aux fluoroquinolones. Ce sont les mutations Gly81(78)Cys, Ser83(80)Arg, Ser83(80)Ile, Asp87(80)Asn et Asp87(80)Tyr (numérotation *M. genitalium* (numérotation *E. coli*)) [28][39].

Prévalence

- En France :

En 2012 et 2013, parmi les échantillons positifs à *M. genitalium* collectés au CHU de Bordeaux, la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones était respectivement de 6,4% et 5,6% [40]. Plus récemment, chez des patients HSH bénéficiant d'une prophylaxie pré-exposition (PreP) pour le VIH, le taux de résistance était de 9,1% (et 67,6% pour les macrolides) [41].

D'après les données du CNR des IST bactériennes, la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones en France métropolitaine était de 15,7% en 2018, 15,6% en 2019 et 16% en 2020.

- Dans le monde :

Une méta-analyse rassemblant les données de *M. genitalium* résistant aux fluoroquinolones par la présence des mutations Ser83Arg, Ser83Ile, Asp87Asn et Asp87Tyr au sein de la protéine ParC a montré une prévalence globale de résistance de 7,7% (IC 95%, 4,5 - 11,4) [28]. Ce pourcentage n'a pas évolué au cours du temps, contrairement à la résistance aux macrolides, mais il est significativement plus élevé dans l'Ouest Pacifique qu'en Europe (Figure 6).

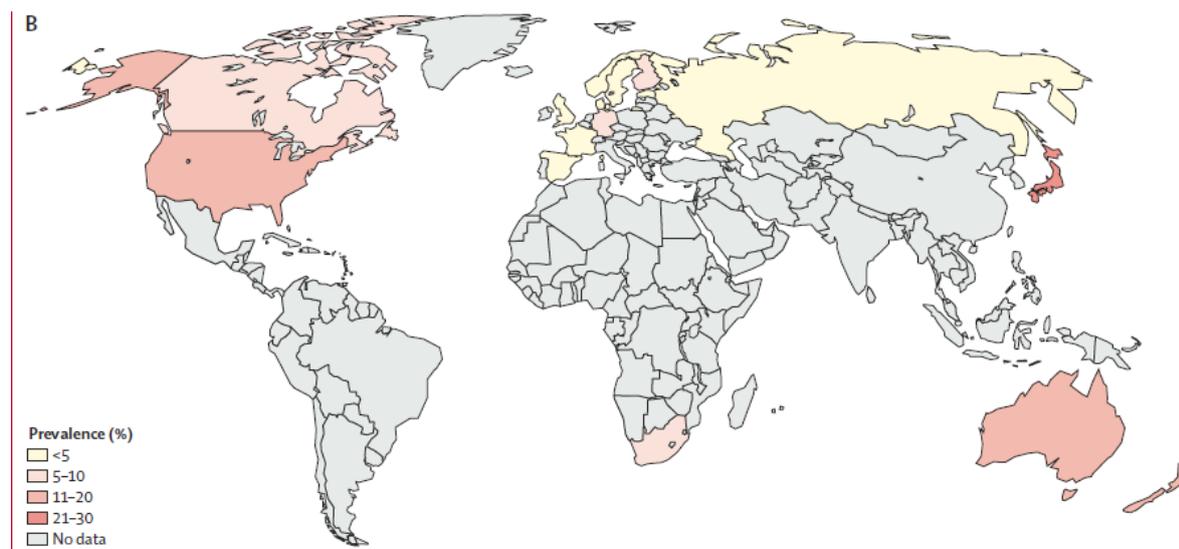


Figure 6 : Prévalence des mutations Ser83Arg, Ser83Ile, Asp87Asn et Asp87Tyr au sein de la protéine ParC associées à la résistance aux fluoroquinolones chez *M. genitalium* [28].

Détection de la résistance dans les échantillons cliniques

La détection des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones est basée sur l'amplification et le séquençage d'un fragment du gène *parC*, associé ou non à *gyrA*. Deux kits commercialisés sont en cours d'évaluation au CNR des IST.

L'identification de *M. genitalium* résistant aux macrolides et aux fluoroquinolones n'est pas rare, représentant jusqu'à 2,8% des échantillons (IC 95%, 1,3 - 4,7), sans changement significatif au cours du temps, ni de variation en fonction des pays (Figure 7) [28].

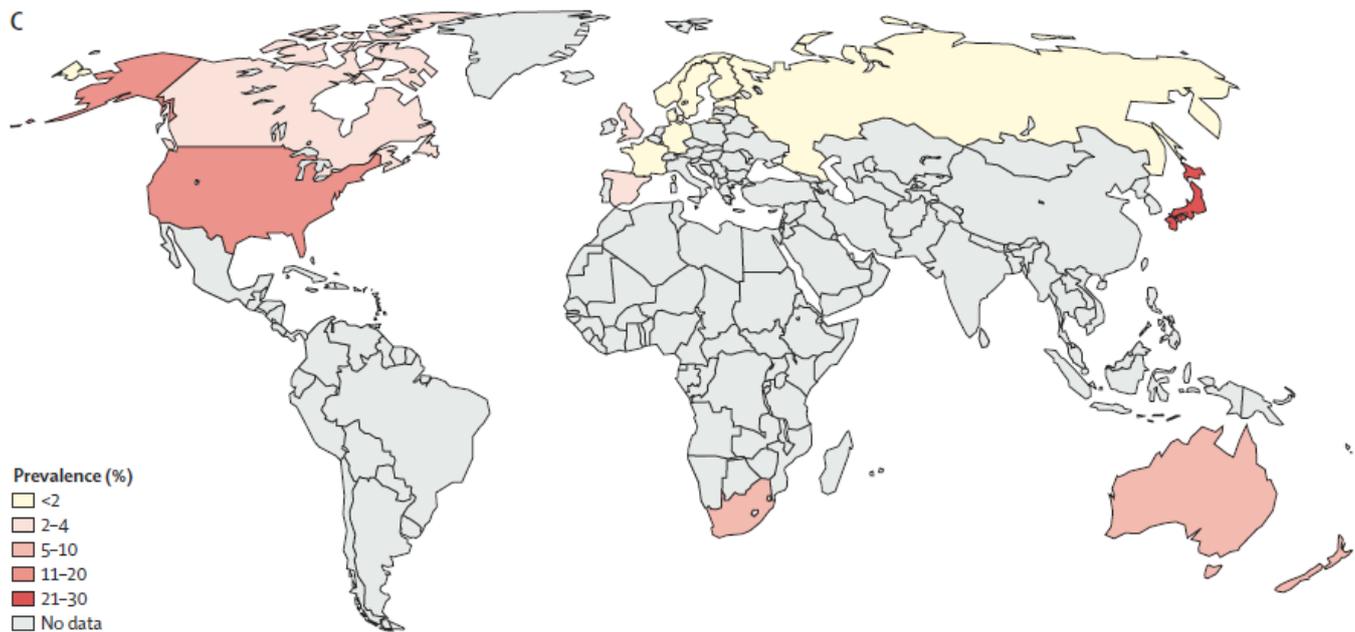


Figure 7 : Prévalence de *M. genitalium* résistant aux macrolides et aux fluoroquinolones [28].

c. Tétracyclines

Bien que les données *in vitro* aient montré que la CMI 50 et la CMI 90 de la doxycycline pour *M. genitalium* étaient respectivement de 0,25 et 1 mg/L, l'efficacité clinique de cette molécule dans le traitement des infections à *M. genitalium* n'est que de 30 à 40%.

À ce jour, aucune mutation spécifique ni l'explication exacte de cette divergence n'ont été rapportées. Des mutations au sein du gène de l'ARNr 16S, pouvant être associées à une résistance aux tétracyclines, ont été identifiées dans des échantillons cliniques [41][42].

4. Recommandations thérapeutiques

Bien que n'ayant qu'une faible efficacité, la doxycycline peut diminuer la charge de *M. genitalium* [43]. L'azithromycine administrée en dose orale unique de 1 g a un taux de guérison d'environ 85% dans les infections sensibles aux macrolides, mais elle entraîne une résistance aux macrolides chez plus de 10% des patients traités [44]. Ainsi, pour éviter la sélection de mutants résistants, il a été recommandé d'administrer l'azithromycine sur cinq jours : 500 mg à J1, puis 250 mg par de J2 à J5 [44].

Recommandations de traitement européennes de 2016 [26]

- Traitement recommandé pour une infection non compliquée à *M. genitalium* en l'absence de mutation de résistance aux macrolides :
 - Azithromycine 500 mg le premier jour, puis 250 mg les jours 2 à 5 (voie orale).
 - Josamycine 500 mg 3 fois par jour pendant 10 jours (voie orale).
- Traitement recommandé pour les infections non compliquées à *M. genitalium* en présence de mutation de résistance aux macrolides :
 - Moxifloxacine 400 mg par jour pendant 7 jours (voie orale).
- Traitement de deuxième intention recommandé pour les infections persistantes non compliquées à *M. genitalium* après un traitement à l'azithromycine :
 - Moxifloxacine 400 mg par jour pendant 7 jours (voie orale).
- Traitement de troisième ligne recommandé en cas d'infection persistante à *M. genitalium* après un traitement à l'azithromycine et à la moxifloxacine :
 - Pristinamycine 1 g quatre fois par jour pendant 10 jours (voie orale).
 - Doxycycline 100 mg deux fois par jour pendant 14 jours (voie orale) : permet d'éradiquer *M. genitalium* chez environ 30 à 40% des patients.
- Traitement recommandé pour les infections compliquées à *M. genitalium* (salpingite, épididymite) :
 - Moxifloxacine 400 mg par jour pendant 14 jours (voie orale).

Les recommandations européennes sont en cours d'actualisation.

La léfamuline a récemment été enregistrée en Europe pour la pneumonie acquise dans la communauté. Elle est très active *in vitro* contre *M. genitalium* présentant une résistance combinée aux macrolides et aux fluoroquinolones [45]. Cependant, seule une expérience anecdotique du traitement de *M. genitalium* est disponible. La posologie appropriée est indéterminée mais un traitement de sept jours est probablement nécessaire.

Recommandations américaines actualisées en 2021 [16]

- Traitement recommandé en cas de *M. genitalium* sensible aux macrolides :
 - Doxycycline 100 mg 2 fois par jour pendant 7 jours, puis azithromycine 1g, suivie par 500 mg par jour pendant 3 jours.

- Traitement recommandé en cas de *M. genitalium* résistant aux macrolides :
 - Doxycycline 100 mg 2 fois par jour pendant 7 jours, puis moxifloxacine 400 mg par jour pendant 7 jours.

- Traitement recommandé en cas d'indisponibilité des tests de résistance pour *M. genitalium* :
 - Doxycycline 100 mg 2 fois par jour pendant 7 jours, puis moxifloxacine 400 mg par jour pendant 7 jours.

Un contrôle d'éradication (Test of cure, TOC) devra être réalisé cinq semaines après l'initiation du traitement.

Un patient ayant contracté une infection à *M. genitalium* doit s'abstenir d'avoir des relations sexuelles non protégées jusqu'à ce qu'il, ainsi que son ou ses partenaire(s), ait pris un traitement antibiotique en respectant les délais, associé à une disparition totale des symptômes.

Une recherche des autres IST est nécessaire (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, VHB, VIH, *T. pallidum*). Il est également primordial de sensibiliser les patients en les informant sur les modes de transmission, les moyens de prévention et les complications possibles.

B. Cohorte Chlazidoxy

Chlazidoxy est un essai clinique randomisé, ouvert, multicentrique comparant l'efficacité de l'azithromycine *versus* la doxycycline pour le traitement de l'infection ano-rectale à *C. trachomatis* concomitante à l'infection vaginale [46].

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Être de sexe féminin.
- Avoir plus de 18 ans.
- Pour les femmes consultant dans les CeGiDD (Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des infections par le VIH, les hépatites virales et les IST), avoir un test de β -hCG urinaire négatif et une contraception efficace (critère HAS) [47].
- Pour les femmes ayant recours à une interruption volontaire de grossesse (IVG), consulter dans un centre d'orthogénie et avoir une contraception efficace à l'issue de l'IVG.
- Avoir un test d'amplification des acides nucléiques positif à *C. trachomatis* sur un prélèvement vaginal.
- Être sexuellement active.
- Consulter dans un des centres participants.
- Accepter d'être contactée pour le suivi prévu dans l'étude.
- Être affiliée ou bénéficier d'un régime de sécurité sociale.
- Avoir signé un consentement libre et éclairé (au plus tard le jour de l'inclusion et avant de procéder à tout examen requis pour l'étude).

Les critères de non-inclusion étaient les suivants :

- Femmes ayant des symptômes évoquant une infection génitale haute.
- Prise d'un antibiotique ayant une activité contre *C. trachomatis* dans les 21 jours précédents l'inclusion dans l'étude.
- Avoir des contre-indications à la prise de tétracyclines, macrolides ou kétolides (incluant allergie, traitement par colchicine, cisapride, rétinoïdes ou alcaloïdes de l'ergot de seigle).
- Incapacité à avaler des gélules.
- Refus de participer à l'étude.

- Objectifs de l'étude non compris.
- Allaitement.
- Patientes atteintes de maladies cardiaques graves : allongement de l'espace QT documenté à l'électrocardiogramme (ECG), arythmie cardiaque, insuffisance cardiaque sévère (NYHA > III).
- Patientes traitées avec des anticoagulants ou des molécules ayant un potentiel certain de « Torsades de Pointe » ou d'allongement de l'espace QT à l'ECG.
- Patientes présentant une maladie hépatique sévère.

Sept centres ont participé à cette étude : les CeGIDD de Bordeaux, Paris, Nantes et Marseille, ainsi que les centres d'orthogénie de Bordeaux, Tours et Roubaix.

Les patients éligibles ont réalisé un auto-prélèvement ano-rectal pour la recherche de *C. trachomatis*. Après signature d'un consentement, les patientes ont été randomisées avec un ratio 1:1 dans le bras azithromycine (1 g dose unique) ou dans le bras doxycycline (100 mg 2 fois par jour pendant 7 jours). Les patientes ont été revues six semaines après le traitement. Les femmes ayant un écouvillon anal positif à *C. trachomatis* à l'inclusion ont fourni un auto-prélèvement vaginal et anal pour la détection de *C. trachomatis* lors de cette visite de suivi.

Au total, 460 patientes ont été incluses dans cette étude : 230 dans le bras azithromycine et 230 dans le bras doxycycline.

Des données démographiques, biologiques et cliniques ont été collectées. Les participantes ont également complété un auto-questionnaire sur leur vie sexuelle, à l'inclusion et à la visite de suivi six semaines après le traitement.

Toutes les données ont été anonymisées.

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de déterminer la prévalence de *M. genitalium* dans les échantillons vaginaux et ano-rectaux recueillis dans le cadre de l'essai clinique Chlazidoxy.

Grâce aux données de la cohorte Chlazidoxy, nous avons comparé les données démographiques, cliniques et biologiques des patientes positives à *M. genitalium* versus les patientes négatives à *M. genitalium*.

Pour les échantillons positifs à *M. genitalium*, nous avons également évalué la charge bactérienne et étudié la prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones.

Les résultats présentés ici portent sur les auto-prélèvements vaginaux et ano-rectaux collectés à l'inclusion. Les échantillons recueillis six semaines après le traitement sont en cours d'analyse ; ils nous permettront d'évaluer l'incidence de l'infection à *M. genitalium* au sein de la cohorte Chlazidoxy et d'étudier l'impact de l'azithromycine et de la doxycycline sur la clairance de *M. genitalium* et l'émergence de résistance.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Échantillons cliniques de la cohorte Chlazidoxy

Au total, 460 patientes ont été incluses dans l'étude Chlazidoxy. Pour 18 patientes, les échantillons n'ont pas été conservés par les centres. Nous avons ainsi obtenu les auto-prélèvements de 442 patientes répartis de la façon suivante :

- Auto-prélèvements vaginal et ano-rectal pour 426 patientes.
- Auto-prélèvement vaginal (sans prélèvement ano-rectal associé) pour 6 patientes.
- Auto-prélèvement ano-rectal (sans prélèvement vaginal associé) pour 10 patientes.

L'anonymat des échantillons a été maintenu tel qu'il a été défini dans le protocole.

Sources des données

Les données utilisées pour cette étude provenaient uniquement des données recueillies dans le cadre de l'étude Chlazidoxy. Des données démographiques (date de naissance, pays de naissance, statut marital, niveau d'éducation, situation professionnelle), biologiques (antécédents d'IST, statut VIH, co-infection avec *N. gonorrhoeae*, sérologie HBV) et cliniques (pertes vaginales, douleurs pelviennes, saignements anormaux, douleurs lors des rapports sexuels, écoulements rectaux, douleurs anales et ténésmes) ont été collectées. Les participantes ont également complété un auto-questionnaire sur leur vie sexuelle (partenaire sexuel régulier, partenaire sexuel occasionnel dans les 12 derniers mois, utilisation de préservatifs, nombre de partenaires sexuels, rapports sexuels anaux).

II. Détection et quantification de *M. genitalium* par PCR en temps réel

1. Extraction de l'ADN

Les extraits d'ADN ont été réalisés à partir de 200 µL de prélèvement avec le MagNA Pure 96 Instrument et le Viral NA Small Volume Kit (Roche diagnostic). Le volume d'élution de l'extrait d'ADN était de 100 µL. Un extrait de la souche de référence *M. genitalium* G37 (ATCC 33530) a été utilisé comme contrôle positif pour la PCR.

Les extraits d'ADN ont été stockés à -20°C avant la réalisation des PCR de détection.

2. PCR en temps réel

a. Principe de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel collige les données d'amplification au point de départ de la phase exponentielle de la PCR. Cette technologie est basée sur la détection d'un « reporter », molécule fluorescente présente dans le milieu réactionnel. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction de PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible originale. La courbe obtenue, d'allure sigmoïdienne, représente l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification (Figure 8) :

→ (1) : durant les premiers cycles, l'émission de fluorescence est très faible, non spécifique. Ceci permet de définir la ligne de base.

→ (2) : phase exponentielle de la PCR et détermination de la ligne de seuil, qui correspond à l'intensité de fluorescence considérée comme significativement différente du bruit de fond. Par définition, elle est située au-dessus de la ligne de base et au début de la phase exponentielle de la PCR. L'intersection de la ligne seuil avec la courbe d'amplification permet, par projection sur l'axe des abscisses, de définir la notion de cycle seuil (Threshold Cycle ou Ct) qui correspond au nombre minimum de cycles d'amplification nécessaire à l'obtention d'une fluorescence significative. Le Ct est directement lié à la quantité de séquence cible présente dans l'échantillon au début de la PCR. Plus le Ct est faible, plus la quantité d'ADN cible est importante.

→ (3) : la fluorescence atteint ensuite une phase de plateau qui traduit une limitation de la synthèse des fragments due à l'épuisement des réactifs du mélange réactionnel.

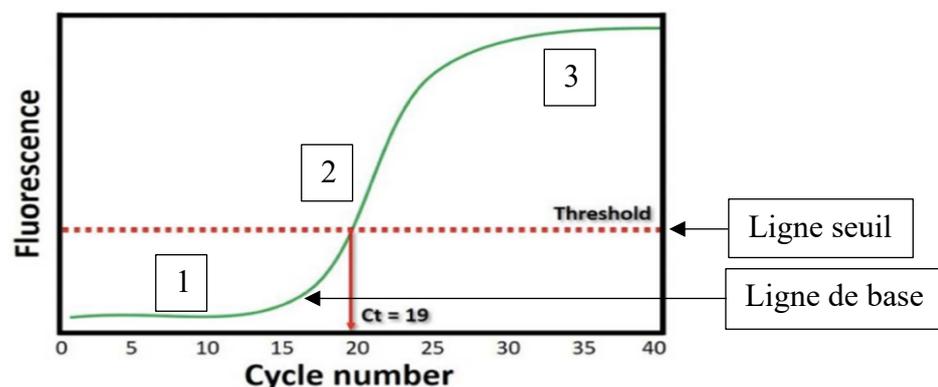


Figure 8 : Exemple de PCR en temps réel.

b. Principe de la PCR TaqMan en temps réel

La génération de la fluorescence peut être réalisée grâce à l'utilisation de sondes. Pour la détection de *M. genitalium*, nous utilisons une sonde oligonucléotidique avec une chimie TaqMan. Le principe de cette chimie repose sur la fonction exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique d'un morceau interne à la séquence amplifiée. Celle-ci est marquée en 5' par un fluorophore appelé « reporter » (R) et en 3' par un autre type de fluorophore appelé « quencher » (Q) (Figure 9). Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du reporter est atténuée ou « quenchée » (éteinte) par la proximité du quencher. Au cours de chaque cycle de PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde oligonucléotidique grâce à son activité 5'-3' exonucléase. Ce phénomène entraîne une dissociation du « complexe quencher-reporter » et donc une augmentation de la fluorescence du reporter qui sera alors mesurée et quantifiée.

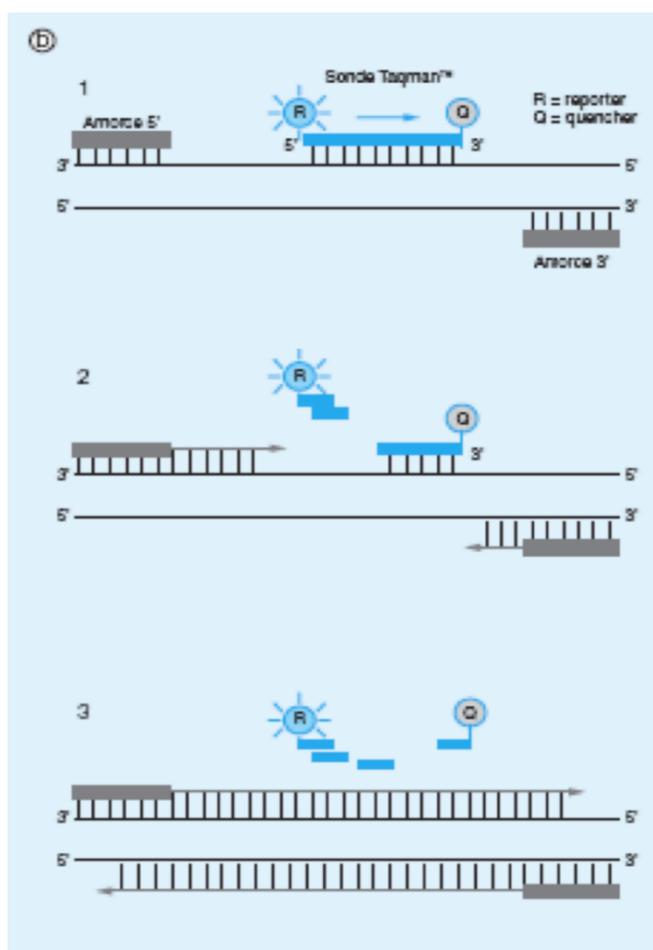


Figure 9 : Principe de la PCR TaqMan [48].

La cible de cette PCR TaqMan est un fragment de 78 pb localisé dans une région conservée du gène *mgpB* codant l'adhésine MgPa [49].

Tableau 3 : Amorces et sonde utilisées pour la PCR TaqMan de quantification de *M. genitalium*.

Gène	Nom des amorces et de la sonde	Séquence (5' → 3')
<i>mgpB</i>	MgPa-355 Forward	GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAA
	MgPa-432 Reverse	GTAATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATC
	MgPa-380	FAM-ACTTTGCAATCAGAAGGT-MGB-NFQ

Le mélange réactionnel utilisé a été réalisé avec le kit Light Cycler 480 Probes Master Mix 2X (Roche). Celui-ci est composé de différents éléments indispensables à la réalisation d'une PCR, à savoir :

- la sonde.
- les amorces.
- le Master Mix 2X, qui contient les bases nucléotidiques et la Taq polymérase. La Taq polymérase est une ADN polymérase thermostable, c'est-à-dire qu'elle résiste à la chaleur et reste donc intacte lors de la dénaturation.

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR TaqMan de quantification de *M. genitalium*.

Produit (concentration initiale)	Concentration finale	Volume pour 1 échantillon (µL)
Master Mix 2X (2X)	1X	12,5
MgPa-355 F (10 µM)	0,3 µM	0,75
MgPa-432 R (10 µM)	0,3 µM	0,75
Sonde MgPa-380 (5 µM)	0,2 µM	1
H ₂ O		5
Volume final		20

Il y a donc 20 µL de mix par puit ainsi que 5 µL d'ADN.

L'étape d'amplification PCR a été réalisée sur l'amplificateur temps réel Cobas Z480 (Roche) selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, puis l'amplification de 45 cycles composée d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et d'une étape d'élongation avec acquisition de fluorescence à 60°C pendant 1 minute.

Chaque PCR contient un témoin positif (ici le plasmide de calibration pMgPa, cf. paragraphe suivant) et un témoin négatif qui ne contient que le mélange réactionnel.

c. PCR quantitative en temps réel

Afin de déterminer la charge bactérienne de *M. genitalium* dans chaque échantillon, nous avons utilisé une courbe d'étalonnage réalisée avec des dilutions sérielles d'un plasmide contenant une concentration définie d'ADN du gène cible à amplifier.

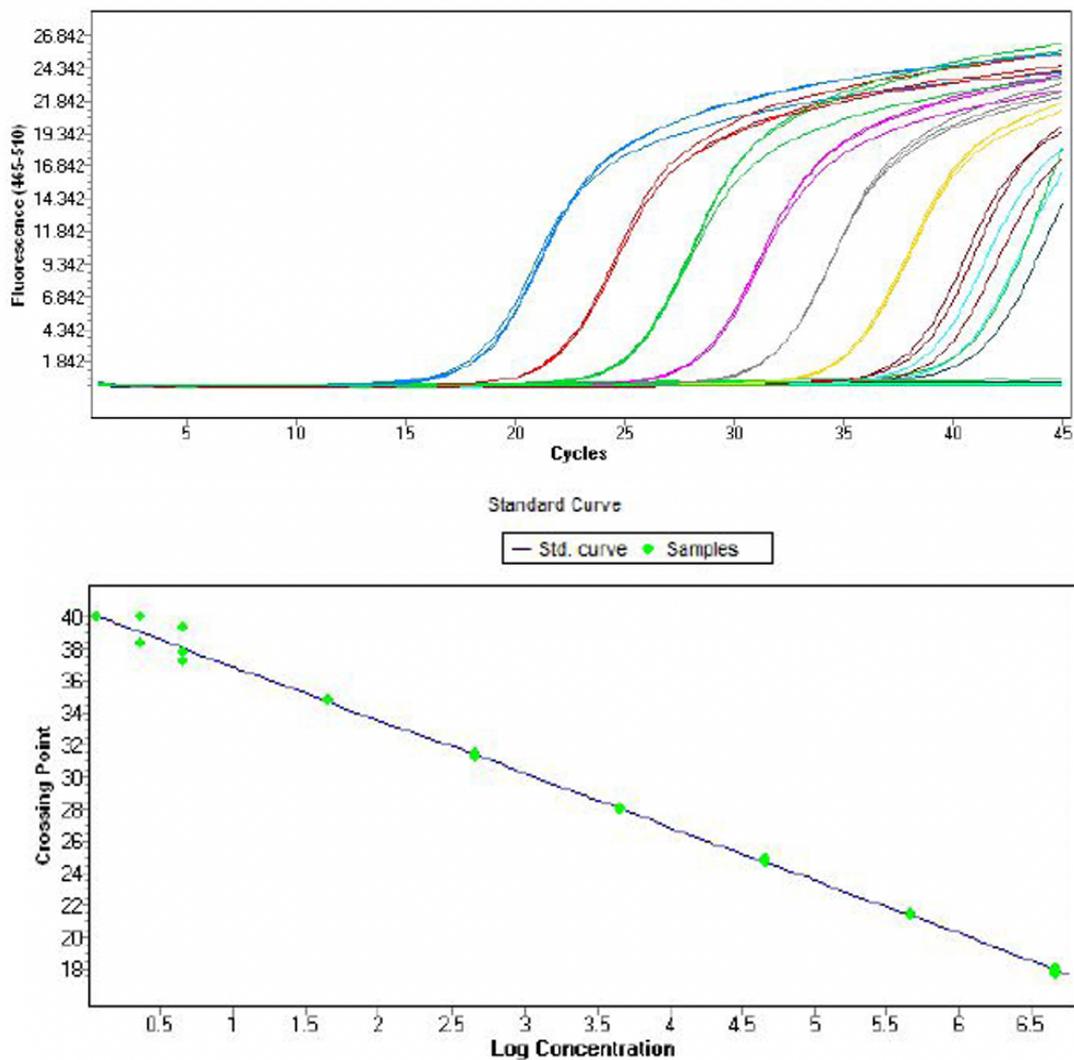


Figure 10 : Courbe d'étalonnage pour la quantification de *M. genitalium*.

La courbe d'étalonnage est enregistrée dans l'automate, ce qui nous permet de passer une seule concentration du plasmide de calibration pMgPa, à savoir celle $4,6 \cdot 10^5$ copies/ μ L. En incluant dans la réaction un témoin positif de concentration connue, la concentration pour chaque Ct

peut alors être déterminée. La limite de détection de notre technique de quantification de *M. genitalium* est de 40Ct, soit 2,45 copies/ μ L (données du laboratoire non publiées). Au-delà de 40 Ct, la PCR est considérée négative.

À l'issue de ce programme d'amplification, les résultats sont analysés *via* le logiciel LightCycler480 Software. La quantification en *M. genitalium* est réalisée en copies/ μ L en utilisant la courbe de calibration réalisée avec le plasmide pMgPa utilisé comme standard ($4,6 \cdot 10^5$ copies/ μ L).

III. Détection de la résistance aux macrolides

1. PCR en temps réel de type FRET

Pour détecter une mutation dans la séquence du gène de l'ARNr 23S et donc une éventuelle résistance aux macrolides, les extraits d'ADN ont été soumis à une PCR en temps réel de type FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) afin d'amplifier la séquence cible d'intérêt [35]. Le FRET est basé sur un transfert d'énergie entre une molécule fluorescente (appelée fluorophore donneur) à une autre molécule fluorescente adjacente (appelée fluorophore accepteur). Le fluorophore donneur utilisé dans notre technique est la fluorescéine et les fluorophores accepteurs les LightCycler-Red (LC-Red 640 et LC-Red 705). Lors de la PCR, le LightCycler® émet un faisceau lumineux qui excite la fluorescéine. La fluorescéine émet alors une fluorescence qui, par transfert d'énergie, excite le LC-Red. Celui-ci émet à son tour une fluorescence qui sera mesurée à une longueur d'onde spécifique.

Deux conditions sont nécessaires à la réalisation du FRET :

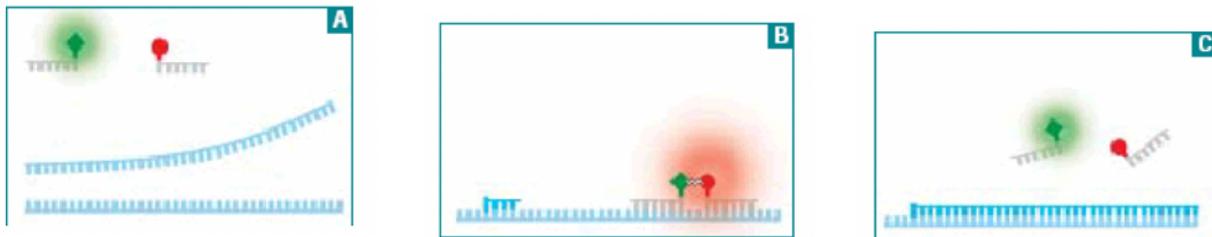
- les fluorophores donneur et accepteur doivent être distants de un à cinq nucléotides maximum.
- le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'excitation de l'accepteur.

La Figure 11 montre le comportement des sondes pendant les différentes étapes de la PCR :

A - Durant la phase de dénaturation, les deux sondes sont libres en solution, elles ne s'hybrident pas à l'ADN. Le faisceau lumineux excite la fluorescéine mais les deux fluorophores sont trop éloignés l'un de l'autre pour que le FRET s'effectue.

B - Lors de la phase d'hybridation, l'ADN est sous forme simple brin et les sondes s'hybrident à la séquence cible. Les deux fluorophores sont alors à proximité l'un de l'autre (un à cinq nucléotides les séparent au maximum) et le FRET a lieu. Le LC-Red émet une fluorescence mesurée à 640 nm s'il s'agit du LC-Red 640 ou à 705 nm s'il s'agit du LC-Red 705.

C - Pendant la phase d'élongation, l'augmentation de température permet l'élongation et entraîne un déplacement des sondes. Celles-ci sont à nouveau libres en solution et le FRET ne se produit pas.



- ◆ Sonde d'ancrage : fluorescéine en 3'
- Sonde de détection : LCRed en 5'

Figure 11 : Principe des sondes d'hybridation (<https://www.rochediagnostics.com>).

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Les principaux critères de détermination du T_m sont :

- le pourcentage de bases G + C (GC%).
- la longueur du fragment.
- le degré de complémentarité entre les brins.

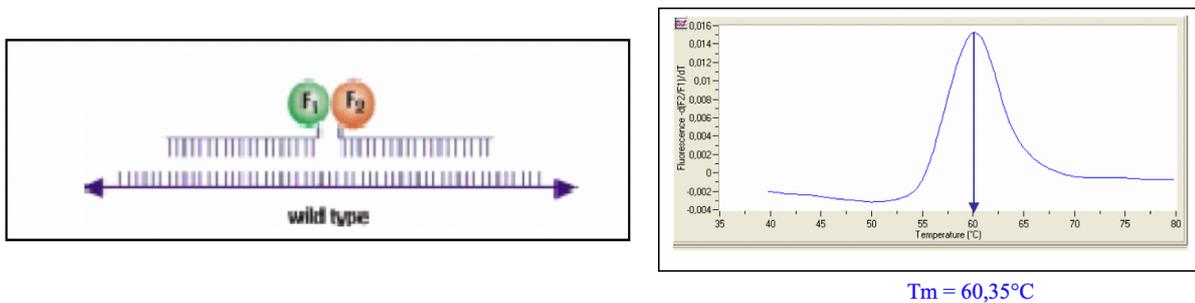
Une dénaturation par la chaleur est nécessaire avant la réalisation des courbes de dissociation. Au départ, la température est basse et la fluorescence mesurée est intense car les sondes sont hybridées l'une à côté de l'autre sur les ADN simples brins dénaturés. Il y a ensuite une augmentation progressive et rapide de la température ($0,2^\circ\text{C/s}$) avec une lecture en continu de la fluorescence émise. Lorsque la température atteint le T_m du fragment à analyser, les sondes sont libérées dans le milieu réactionnel, ce qui entraîne une diminution brutale du signal fluorescent.

La Figure 12 illustre des exemples de courbes de dissociation :

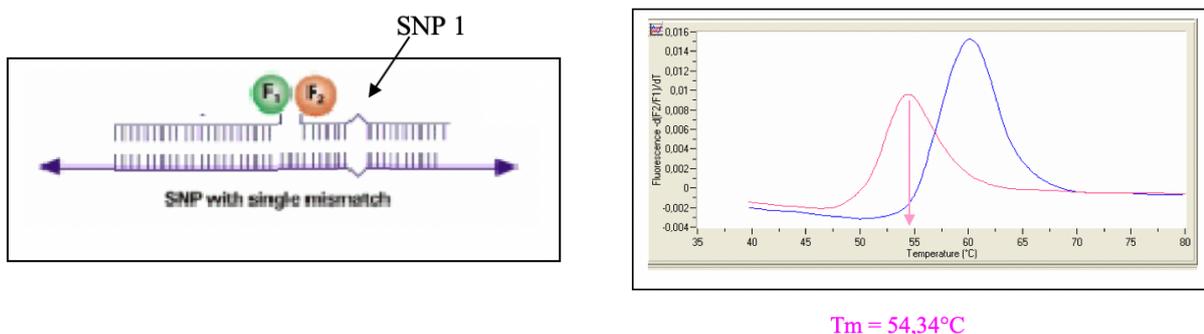
A - Exemple avec deux sondes qui hybrident parfaitement avec leur séquence cible. L'étude de la dérivée première négative $-dF/dT$ permet de déterminer le T_m du fragment d'ADN vis-à-vis du couple de sondes. Ici, le T_m est de $60,35^\circ\text{C}$ pour une hybridation de 100%.

B - C : Exemples en présence d'un Single Nucleotide Polymorphism (SNP) entre la sonde de détection et la séquence cible. La présence d'un seul mismatch entre la sonde de détection et l'ADN cible entraîne une forte diminution du T_m car l'hybridation est beaucoup moins stable que lors d'une identité parfaite entre séquence cible et sonde de détection, ce qui entraîne une dissociation plus rapide de l'hétéroduplex. La position du SNP et le type de base substituée influent sur la rapidité de dissociation, et donc sur le T_m obtenu.

A - Hybridation parfaite entre sondes et séquence cible.



B - Présence d'un Single Nucleotide Polymorphism (SNP), appelé ici SNP 1, entre la sonde de détection et la séquence cible.



C - Présence d'un Single Nucleotide Polymorphism (SNP), appelé ici SNP 2, entre la sonde de détection et la séquence cible.

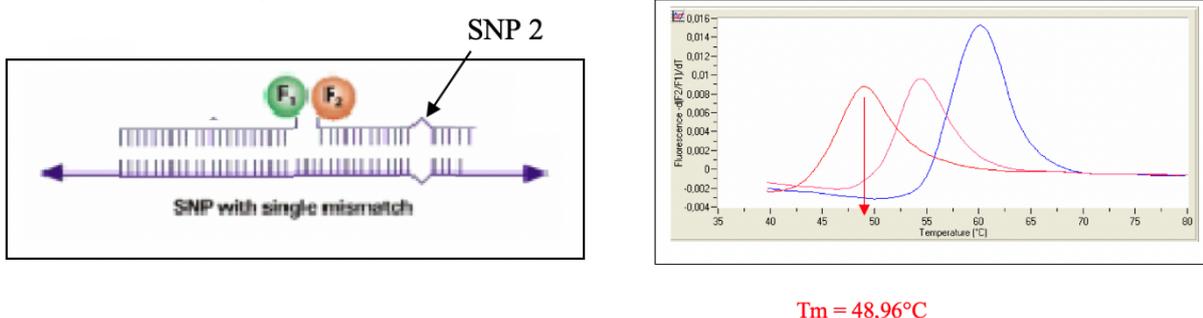


Figure 12 : Courbes de dissociation obtenues en fonction de l'appariement parfait ou non entre la sonde de détection et la séquence cible.

La technique FRET mise au point au laboratoire pour la détection des mutations au sein de l'ARNr 23S amplifie un fragment de 266 pb [35].

Les mutations détectées par cette technique sont localisées en positions 2058 et 2059.

Les amorces et sondes utilisées pour cette PCR sont mentionnées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Amorces et sondes utilisées pour la PCR de type FRET pour la détection des mutations de l'ARNr 23S.

Gène	Nom des amorces et des sondes	Séquence (5' → 3')
ARNr 23S	F1-Mg	GAAGGAGGTTAGCAATTTATTGC
	R1-Mg	TTCTCTACATGGTGGTGTTTTG
	A-2058Hp	CGGGTGAAGACACCCGTTAGGC- Fluorescéine
	S-2050Hp	LC-Red 640-ACGGGACGGAAAGACC- Phosphate

Le mélange réactionnel utilisé pour l'amplification des extraits d'ADN a été réalisé avec le kit LightCycler Fast Start DNA Master HybProbes (Roche) (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel pour réaliser la PCR de type FRET.

Produits	Concentration initiale (µM)	Concentration finale (µM)	Volume pour 1 réaction (µL)
H ₂ O	-	-	5.4
Master Mix 10X	10X	1X	2
MgCl ₂	fourni	fourni	1.6
F1-Mg	5	0,25	1
R1-Mg	5	0,25	1
A-2058Hp	2	0,2	2
S-2058Hp	2	0,2	2
Volume final (µL)	-	-	15

Nous avons donc un volume final de 15 µL de mix par puit, auxquels seront ajoutés 5 µL d'ADN.

La PCR a été réalisée sur l'amplificateur temps réel Cobas Z480 (Roche) selon le programme présenté dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Programme de la PCR de type FRET.

Programme	Étape	Température (°C)	Temps (min : sec)	Nombre de cycles
Dénaturation	-	95	10 :00	1
Amplification	Dénaturation	95	00 :10	50
	Hybridation	58	00 :20	
	Élongation	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

Chaque produit d'amplification est caractérisé par son T_m. Le T_m étant dépendant de la composition en nucléotides du fragment amplifié, la valeur de celui-ci permet d'objectiver une substitution nucléotidique par rapport à la séquence sauvage (notée WT, wild-type) (Figure 13).

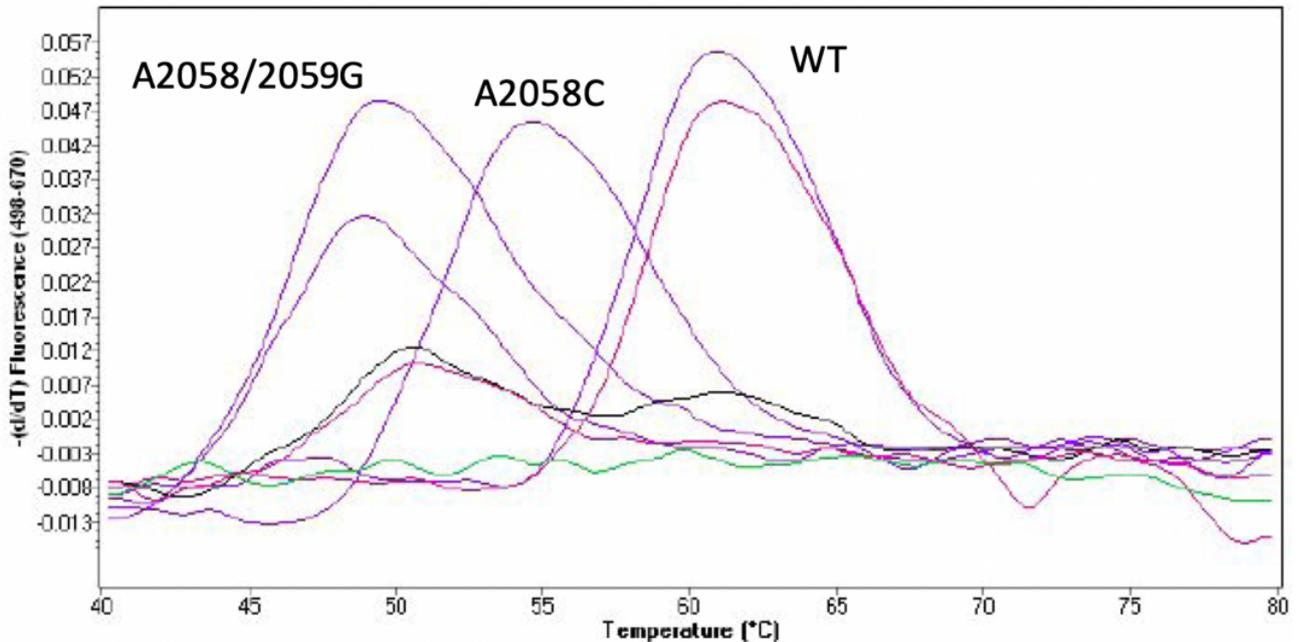


Figure 13 : Profil des courbes de fusion en fonction des mutations de l'ARNr 23S chez *M. genitalium*.

Nous voyons ainsi que :

- la souche sauvage (WT) a un T_m à 60°C.
- la souche présentant la mutation A2058C a un T_m à 55°C.
- la souche présentant la mutation A2058G ou A2059G a un T_m à 50°C.

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 . De même, les souches portant la mutation A2062T ont un T_m équivalent à celui des souches sauvages.

Afin de déterminer la position exacte des mutations et de détecter les potentiels mélanges de population, nous avons réalisé un séquençage Sanger sur les produits PCR obtenus.

2. Séquençage de l'ARNr 23S

Il s'agit d'un séquençage de type Sanger dont le principe est d'hybrider, après dénaturation de l'ADN, une amorce oligonucléotidique avec la séquence ADN d'intérêt. Il est ensuite ajouté au mélange réactionnel :

- des nucléotides libres (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- une ADN polymérase.
- des didésoxyribonucléotides ddNTP. Ces ddNTP vont jouer un rôle clef puisqu'une fois incorporés, ils arrêtent la synthèse du brin d'ADN par l'ADN polymérase. Nous obtenons alors des fragments de taille variable qui vont être séparés par électrophorèse sur capillaire, ce qui va permettre de dévoiler la séquence d'ADN.

Les produits PCR obtenus lors de la PCR FRET ARNr 23S ont été envoyés à Eurofins[®] genomics pour être purifiés puis séquencés par la méthode de Sanger. Pour ce faire, l'envoi de 15 μ L de produit PCR et 10 μ L d'amorce (concentration à 10 μ M) étaient 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 *M. genitalium* G37 avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor afin de déterminer la position exacte de la mutation.

IV. Détection de la résistance aux fluoroquinolones

Pour les échantillons positifs à *M. genitalium*, nous avons recherché les mutations au niveau des QRDR, c'est-à-dire au niveau des différentes régions des gènes *parC* et *gyrA* susceptibles de contenir des mutations entraînant une résistance aux fluoroquinolones. Pour ce faire, nous avons effectué une PCR en point final sur les extraits d'ADN, puis avons séquencé les amplicons. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées à la séquence de la souche de référence *M. genitalium* G37.

Nous avons réalisé dans un premier temps la recherche de mutations du gène *parC* de tous les prélèvements positifs à *M. genitalium*. Dans un second temps, nous avons recherché les mutations au niveau du gène *gyrA*, uniquement pour les échantillons présentant une mutation au sein du gène *parC*.

1. PCR en point final

Par opposition à la PCR en temps réel, la détection de l'ADN est visualisée à la fin de la réaction.

Les amorces utilisées pour amplifier les régions cibles des gènes *gyrA* et *parC* sont mentionnées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Amorces utilisées pour l'amplification des QRDR *gyrA* et *parC*.

Gène	Amorces	Séquences	Tm (°C)	Taille (pb)	Références
<i>gyrA</i>	MG-gyrA-F	5'-CGTCGTGTTCTTTATGGTGC-3'	60	231	[39]
	MG-gyrA-R	5'-ATAACGTTGTGCAGCAGGTC-3'	60		
<i>parC</i>	MG-parC-A	5'-TGGGCTTAAAACCCACCACT-3'	58,4	214	[50]
	MG-parC-B	5'-CGGGTTTCTGTGTAACGCAT-3'	58,4		

Le mélange réactionnel utilisé pour l'amplification des extraits d'ADN a été réalisé avec le kit GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega) et est référencé dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR en point final.

Produit (concentration initiale)	Concentration finale	Volume pour 1 réaction (μL)
Tampon Taq (5X)	1X	10
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	3
dNTP (10 mM)	200 μM	1
Amorce sens (100 μM)	0,2 μM	0,1
Amorce anti-sens (100 μM)	0,2 μM	0,1
Taq (5 U/ μL)	5 U	1
H ₂ O		29,8
Volume final		45

Le volume final est de 50 μL dont 5 μL d'extrait d'ADN et 45 μL de mélange réactionnel. Le témoin positif est une souche de référence *M. genitalium* G37 et le témoin négatif contient uniquement du mélange réactionnel.

L'amplification a été réalisée avec le thermocycleur VeritiPro Thermal Cycler (Applied Biosystem) selon le programme d'amplification décrit dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Programme de la PCR en point final.

Programme	Étape	Température (°C)	Temps (min : sec)	Nombre de cycles
Dénaturation	-	95	15 : 00	1
Amplification	Dénaturation	95	00 : 30	40
	Hybridation	58	00 : 30	
	Élongation	72	00 : 30	
Élongation	-	72	10 : 00	1
Refroidissement	-	14	∞	0

Suite au programme d'amplification, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose de 2% contenant 5 μL pour 100 μL d'un intercalant d'ADN (Midori Green[®]) afin d'être détectés par électrophorèse. Un volume de 5 μL d'amplifiât ou de marqueur de taille (Thermo Scientific 100 pb) est lui aussi déposé et le tampon de migration utilisé est le TAE (Eurobio[®]) concentré

à 1X. La durée de la migration des produits de PCR était de 20 minutes et a été réalisée à 100V. Une fois la migration terminée, le gel a été révélé sous ultra-violet (254 nm) puis photographié.

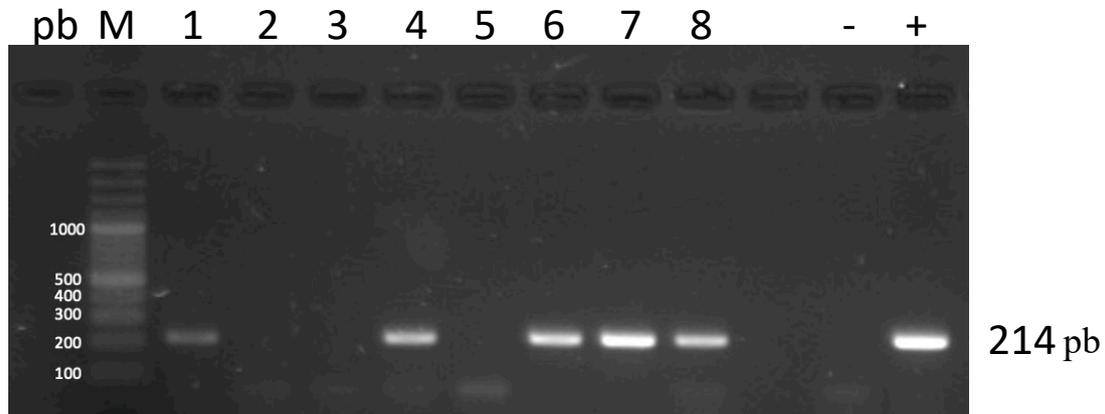


Figure 14 : Photographie d'une électrophorèse sur gel d'agarose révélée sous rayons UV.

2. Séquençage

Les produits PCR ont été envoyés à Eurofins genomics pour être purifiés puis séquencés par méthode Sanger. Pour ce faire, l'envoi de 15 μ L de produit PCR et de 10 μ L d'amorce (concentration de 10 μ M) est nécessaire par réaction. L'amorce sens MG-parC-A est utilisée pour le séquençage du gène *parC* et l'amorce MG-gyrA-F est utilisée pour le séquençage du gène *gyrA*.

L'analyse des séquences d'ADN a ensuite été réalisée via le logiciel BioEdit et comparée à celle de la souche de référence *M. genitalium* G37. En cas de mutation, la séquence d'ADN a été traduite en séquence protéique avec le logiciel du site <http://www.bioinformatics.org/sms/> en utilisant le code génétique des mycoplasmes. Les séquences protéiques ont ensuite été comparées à celle de la souche de référence *M. genitalium* G37 afin de constater si la mutation entraîne la modification d'un acide aminé.

La présence de mutations n'aboutit pas forcément à un phénotype de résistance. En effet, certains changements d'acides nucléotidiques n'entraînent pas de changement d'acide aminé et donc, *in fine*, pas 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 et donc de la protéine, ce qui peut aboutir au développement de résistance puisque l'antibiotique ne reconnaît plus sa cible.

RÉSULTATS

I. Prévalence de l'infection à *M. genitalium* au sein de la cohorte Chlazidoxy

Nous avons recherché la présence de *M. genitalium* dans les 868 écouvillons recueillis à l'inclusion, correspondant aux 442 patientes de la cohorte Chlazidoxy (Figure 15).

Parmi les 432 écouvillons vaginaux analysés, 81 étaient positifs à *M. genitalium*.

Parmi les 436 écouvillons ano-rectaux analysés, 58 étaient positifs à *M. genitalium*.

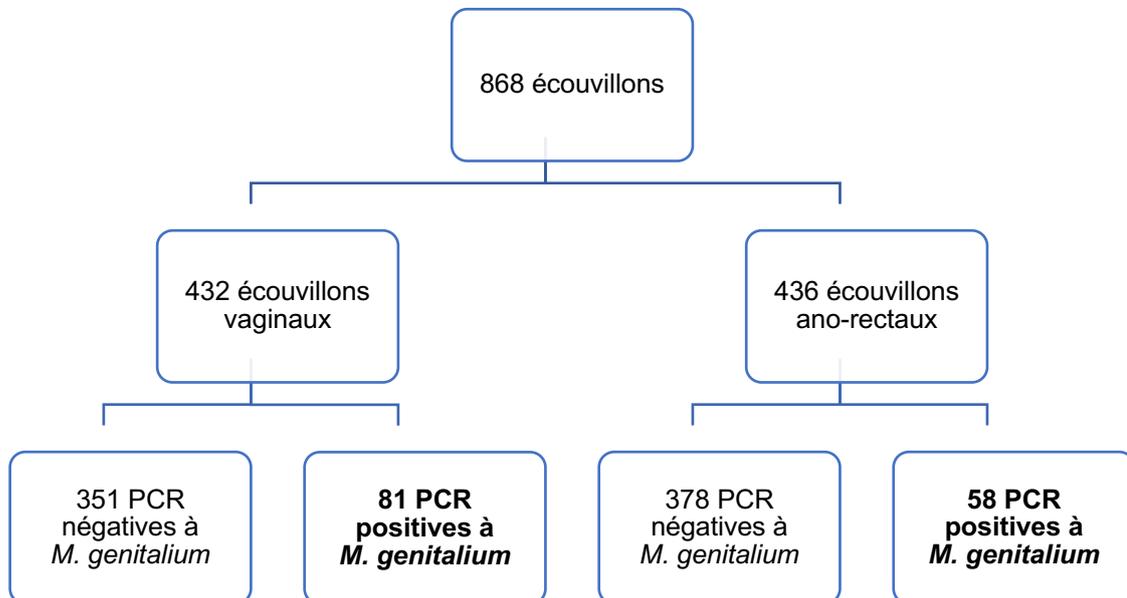


Figure 15 : Nombre d'échantillons vaginaux et ano-rectaux négatifs et positifs à *M. genitalium*.

Nous avons donc un total de 139 prélèvements positifs à *M. genitalium* correspondant à 102 patientes (Tableau 11) :

- 37 patientes ont un écouvillon vaginal et ano-rectal positifs à *M. genitalium*.
- 44 patientes ont seulement l'écouvillon vaginal positif à *M. genitalium*.
- 21 patientes ont seulement l'écouvillon ano-rectal positif à *M. genitalium*.

Tableau 11 : Patientes ayant une infection vaginale et/ou ano-rectale à *M. genitalium* au sein de la cohorte Chlazidoxy.

Identification de la patiente	Résultats de la PCR de détection de <i>M. genitalium</i>		Identification de la patiente	Résultats de la PCR de détection de <i>M. genitalium</i>	
	Vagin	Anus		Vagin	Anus
Patiente 1	Positive	Négative	Patiente 39	Positive	Positive
Patiente 2	Positive	Positive	Patiente 40	Positive	Négative
Patiente 3	Positive	Positive	Patiente 41	Négative	Positive
Patiente 4	Positive	Négative	Patiente 42	Positive	Négative
Patiente 5	Positive	Positive	Patiente 43	Négative	Positive
Patiente 6	Positive	Positive	Patiente 44	Positive	NT
Patiente 7	NT	Positive	Patiente 45	Positive	Négative
Patiente 8	Positive	Positive	Patiente 46	Positive	Négative
Patiente 9	Négative	Positive	Patiente 47	Positive	Négative
Patiente 10	Positive	Négative	Patiente 48	Négative	Positive
Patiente 11	Négative	Positive	Patiente 49	Positive	Positive
Patiente 12	Positive	Négative	Patiente 50	Positive	Positive
Patiente 13	Négative	Positive	Patiente 51	Positive	Négative
Patiente 14	Positive	Négative	Patiente 52	Positive	Négative
Patiente 15	Positive	Positive	Patiente 53	Positive	Négative
Patiente 16	Positive	Négative	Patiente 54	Positive	Négative
Patiente 17	Positive	Positive	Patiente 55	Positive	Positive
Patiente 18	Négative	Positive	Patiente 56	Positive	Négative
Patiente 19	Positive	Positive	Patiente 57	Positive	Négative
Patiente 20	Positive	Positive	Patiente 58	Positive	Négative
Patiente 21	Positive	Positive	Patiente 59	Positive	Négative
Patiente 22	Positive	Négative	Patiente 60	Positive	Positive
Patiente 23	Positive	Négative	Patiente 61	Positive	Positive
Patiente 24	Positive	Positive	Patiente 62	Positive	Positive
Patiente 25	Positive	Négative	Patiente 63	Positive	Positive
Patiente 26	Négative	Positive	Patiente 64	Positive	Négative
Patiente 27	Positive	Négative	Patiente 65	Négative	Positive
Patiente 28	Négative	Positive	Patiente 66	Positive	Positive
Patiente 29	Positive	Positive	Patiente 67	Négative	Positive
Patiente 30	Positive	Positive	Patiente 68	Positive	Négative
Patiente 31	Négative	Positive	Patiente 69	Négative	Positive
Patiente 32	Positive	Positive	Patiente 70	Positive	Négative
Patiente 33	Positive	Négative	Patiente 71	Positive	Positive
Patiente 34	Positive	Négative	Patiente 72	Négative	Positive
Patiente 35	Positive	Négative	Patiente 73	Positive	Négative
Patiente 36	Négative	Positive	Patiente 74	Positive	Positive
Patiente 37	NT	Positive	Patiente 75	Positive	NT
Patiente 38	Positive	Positive	Patiente 76	Positive	Négative

Identification de la patiente	Résultats de la PCR de détection de <i>M. genitalium</i>	
	Vagin	Anus
Patiente 77	NT	Positive
Patiente 78	Négative	Positive
Patiente 79	Négative	Positive
Patiente 80	Positive	Négative
Patiente 81	Positive	Positive
Patiente 82	Positive	Positive
Patiente 83	Positive	Positive
Patiente 84	Positive	Négative
Patiente 85	Positive	Positive
Patiente 86	Positive	Positive
Patiente 87	Positive	Positive
Patiente 88	Positive	Positive
Patiente 89	Négative	Positive
Patiente 90	Positive	Négative
Patiente 91	Positive	Positive
Patiente 92	Positive	Positive
Patiente 93	Positive	Négative
Patiente 94	Positive	Négative
Patiente 95	Positive	Positive
Patiente 96	Positive	Positive
Patiente 97	Positive	Négative
Patiente 98	Positive	Négative
Patiente 99	Positive	Négative
Patiente 100	Positive	Négative
Patiente 101	Positive	Négative
Patiente 102	Positive	Négative

NT : non testé.

La prévalence de l'infection à *M. genitalium* au sein de la cohorte Chlazidoxy était de **23,07%** (102/442).

Nous avons regardé la prévalence de l'infection à *M. genitalium* en fonction des centres ayant participé à l'étude Chlazidoxy. Celle-ci variait de 10,4% pour le centre d'orthogénie de Tours à 68,4% pour le centre d'orthogénie de Roubaix (Tableau 12).

Tableau 12 : Prévalence de l'infection à *M. genitalium* par centre.

Centre	Nombre de patientes par centre	Nombre de patientes positives à <i>M. genitalium</i>			
		Vagin + uniquement	Anus + uniquement	Vagin + Anus +	Total
1 – Orthogénie Bordeaux	73	6	5	7	18 (24,6%)
2 – CeGIDD Bordeaux	50	5	3	7	15 (30%)
3 – CeGIDD Marseille	172	14	5	4	23 (13,4%)
4 – CeGIDD Nantes	67	9	7	9	25 (37,3%)
5 – CeGIDD Guy Moquet Paris	13	1	0	2	3 (23,1%)
6 – Orthogénie Roubaix	19	4	1	8	13 (68,4%)
7 – Orthogénie Tours	48	5	0	0	5 (10,4%)
Total	442	44	21	37	102 (23,07%)

II. Données démographiques et clinico-biologiques

Nous avons analysé les données démographiques, clinico-biologiques et les données concernant les pratiques sexuelles des patientes de la cohorte Chlazidoxy, afin de mettre en évidence de potentiels facteurs de risque d'infection à *M. genitalium*.

Nous avons comparé les données des patientes ayant une infection à *M. genitalium* à celles ne présentant pas cette infection.

La moyenne d'âge était de 22,8 ans dans chaque groupe (Tableau 13). Quel que soit le statut de l'infection à *M. genitalium*, la majorité des patientes était née en France, deux tiers d'entre elles étaient célibataires et avaient un niveau d'éducation élevé. La majorité des patientes était des étudiantes ou des employées.

Tableau 13 : Données démographiques des patientes positives et négatives à *M. genitalium*.

Variables	Patientes positives à <i>M. genitalium</i> N = 102 n (%)	Patientes négatives à <i>M. genitalium</i> N = 340 n (%)	p
Âge (années)			
Moyenne, Écart-type	22, 8 - 4,7	22, 8 - 4,7	
Médiane (min – max)	22 [18-48]	22 [18-48]	
Pays de naissance			
France (incluant les DOM-TOM)	95 (93,1)	291 (85,8)	0,06
Autre	7 (6,9)	49 (14,2)	
Statut marital			
Célibataire	67 (65,7)	227 (67)	0,9
Autre	35 (34,3)	113 (33)	
Niveau d'éducation			
Élevé	70 (68,6)	243 (71,7)	0,62
Bas	32 (31,4)	97 (28,3)	
Situation professionnelle			
Employée	37 (36,3)	123 (36,3)	0,39
Étudiante	45 (44,1)	168 (49,6)	
Autre	20 (19,6)	49 (14,2)	

Concernant les données clinico-biologiques, nous n'observons pas de différences entre le groupe de patientes présentant une infection à *M. genitalium* et le groupe non infecté (Tableau 14). La majorité des patientes n'avait aucun antécédent d'IST. Toutes les patientes étaient séronégatives pour le VIH.

La moitié des patientes rapportait des symptômes vaginaux, pouvant être en lien avec l'infection vaginale à *C. trachomatis* (les patientes incluses dans Chlazidoxy avaient toutes un écouvillon vaginal positif à *C. trachomatis*).

En revanche, plus de 90% des patientes ne présentaient aucun symptôme au niveau anal. Dans plus de la moitié des cas (58,6% ; 34/58), les patientes présentaient une co-infection *C. trachomatis*/*M. genitalium* au niveau anal.

Environ 80% des patientes ont eu leur premier rapport sexuel entre 15 et 19 ans. Dans les deux groupes, un tiers des patientes avait un partenaire sexuel régulier. Un partenaire occasionnel était rapporté chez 32,7% des patientes non infectées à *M. genitalium* versus 20,8% chez les patientes infectées. Avoir un partenaire régulier et occasionnel était rapporté chez 42,6% des patientes positives à *M. genitalium* versus 36,3% des patientes négatives. Parmi les 58 patientes présentant une infection anale à *M. genitalium*, 37 (63,8%) ne rapportaient pas de rapports sexuels anaux.

Tableau 14 : Données clinico-biologiques des patientes positives et négatives à *M. genitalium*.

Variables	Patientes positives à <i>M. genitalium</i> N = 102 n (%)	Patientes négatives à <i>M. genitalium</i> N = 340 n (%)	p
Antécédent d'IST			
Oui	18 (17,6)	69 (20,4)	0,59
Non	80 (78,4)	263 (77,6)	
Inconnu	4 (3,9)	8 (2,1)	
<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=18)			
Oui	17 (94,4)	60 (87)	0,37
Non	0	8 (11,6)	
Inconnu	1 (5,6)	1 (1,4)	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=18)			
Oui	2 (11,1)	18 (26,1)	0,37
Non	15 (83,3)	47 (68,1)	
Inconnu	1 (5,6)	4 (5,8)	
Statut VIH			
Positif	0	0	0,37
Négatif	81 (79,4)	282 (83,2)	
Inconnu	21 (20,6)	58 (16,8)	
Symptômes			
Au niveau vaginal			
Pas de symptôme	56 (54,9)	165 (48,4)	0,3
≥ 1 symptôme	46 (45,1)	175 (51,6)	
Au niveau anal			
Pas de symptôme	92 (90,2)	310 (91,2)	0,84
≥ 1 symptôme	10 (9,8)	30 (8,8)	
Comportement sexuel			
	N = 101 (1 questionnaire non complété)	N = 340	
Âge du premier rapport sexuel			
10 à 14 ans	8 (7,9)	16 (4,7)	0,13
15 à 19 ans	81 (80,2)	287 (84,4)	
20 à 24 ans	12 (11,9)	31 (9,1)	
≥ 25 ans	0	6 (1,8)	
Type de partenaire sexuel durant la dernière année			
Seulement régulier	33 (32,7)	92 (27,1)	0,13
Seulement occasionnel	21 (20,8)	111 (32,7)	
Occasionnel + régulier	43 (42,6)	123 (36,3)	
Non spécifié	4 (4)	14 (3,8)	

Utilisation du préservatif lors d'un rapport avec un partenaire occasionnel			
Toujours	10 (15,6)	44 (18,8)	0,26
Parfois	46 (71,9)	175 (74,8)	
Jamais	8 (12,5)	15 (6,4)	
Nombre total de partenaires sexuels au cours de la vie			
1 à 5	44 (43,6)	148 (43,4)	0,173
6 à 10	19 (18,8)	91 (26,8)	
≥ 11	38 (37,6)	101 (29,8)	
Pratique du sexe anal			
Oui	33 (32,7)	124 (36,6)	0,55
Non	68 (67,3)	216 (63,4)	

Dans notre étude, il n'a pas été observé de différence concernant les données démographiques, clinico-biologiques et le comportement sexuel entre les patientes positives à *M. genitalium* et celles négatives.

III. Charge bactérienne

Nous avons estimé la charge bactérienne de *M. genitalium* pour les 139 échantillons positifs à *M. genitalium*.

Au niveau vaginal, la moyenne était de $1,27 \cdot 10^3$ copies/ μ L versus $2,03 \cdot 10^2$ copies/ μ L pour les échantillons ano-rectaux (Tableau 15, Figure 16). La charge bactérienne est significativement différente en fonction du site de prélèvement (test de Student, $p < 0,05$).

Tableau 15 : Charge bactérienne chez les patientes ayant une PCR *M. genitalium* positive.

	Écouvillons vaginaux		Écouvillons ano-rectaux	
	Ct de détection de la PCR <i>M. genitalium</i>	Quantification (copies / μ L)	Ct de détection de la PCR <i>M. genitalium</i>	Quantification (copies / μ L)
Médiane	-	17,70	-	6,10
Moyenne	36,8	1,27E+03	38,3	2,03E+02
Écart-type	3,1	6,02E+03	2,6	7,65E+02

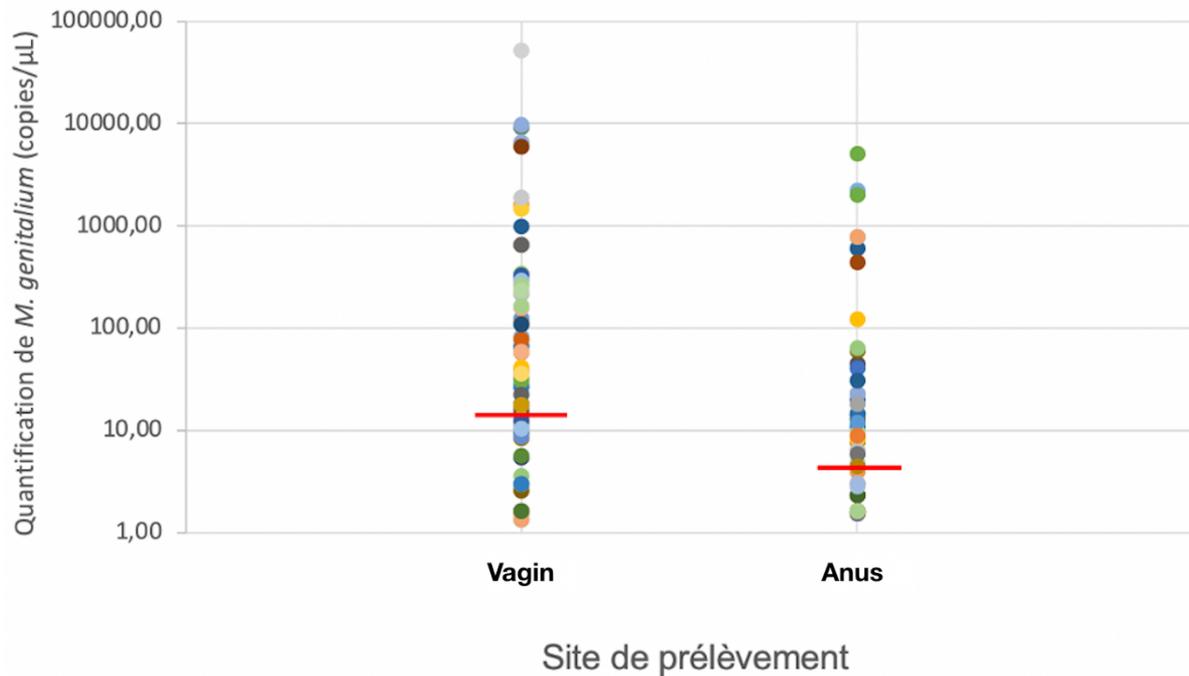


Figure 16 : Charge bactérienne de *M. genitalium* selon le site de prélèvement.

Si nous analysons par type de centre, la charge bactérienne est significativement plus élevée chez les patientes venant de CeGIDD (médiane = 14,40 copies/μL) [1,52 - 9730] que chez les patientes incluses dans les centres d'orthogénie (médiane = 10,90 copies/μL) [1,55 - 51800] ($p = 0,04$). Cette différence n'est pas notée sur les échantillons ano-rectaux, mais uniquement sur les échantillons vaginaux (médiane = 30,80 *versus* 13,40 ; $p = 0,034$).

Ainsi, la **charge bactérienne** de *M. genitalium* était **significativement supérieure au niveau vaginal** par rapport au niveau ano-rectal.

IV. Prévalence de la résistance aux macrolides

Nous avons recherché la présence de mutations au sein de l'ARNr 23S associées à la résistance aux macrolides par la PCR FRET dans les échantillons positifs à *M. genitalium*.

Un résultat interprétable a été obtenu pour 92 échantillons (Figure 17) :

- 19 présentaient une mutation associée à la résistance aux macrolides.
⇒ 10 échantillons vaginaux et 9 échantillons ano-rectaux.
- 73 présentaient une séquence nucléotidique identique à celle d'une souche sauvage.
⇒ 51 échantillons vaginaux et 22 échantillon ano-rectaux.

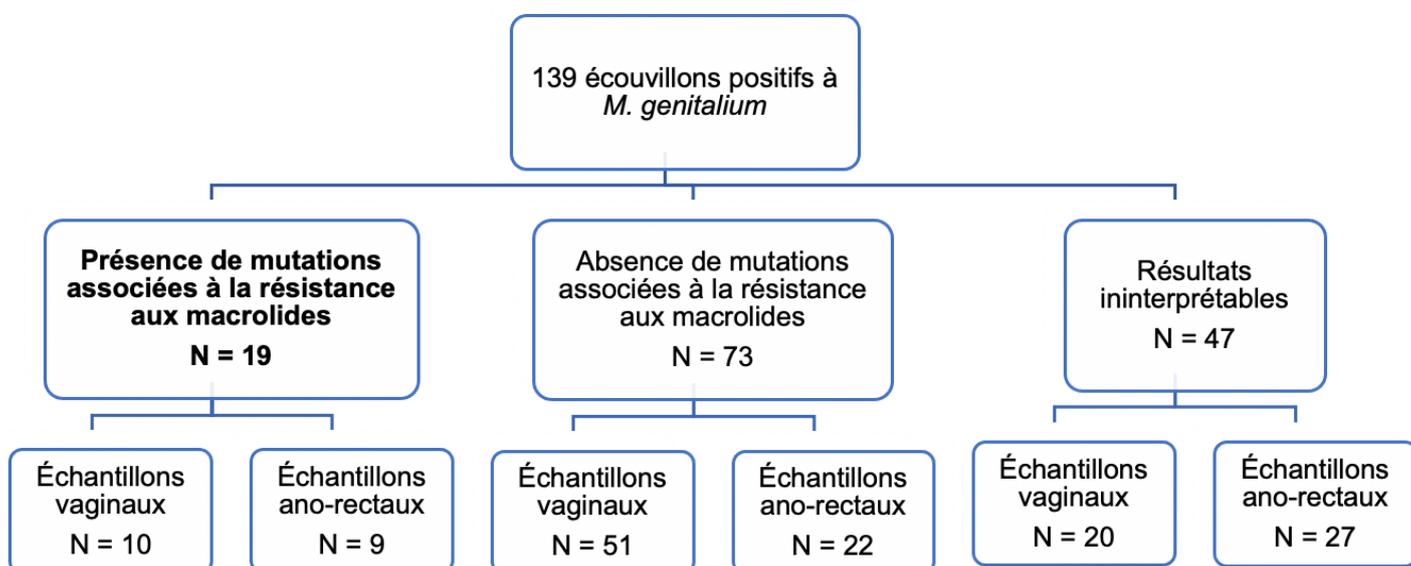


Figure 17 : Résultats de la recherche de mutations associées à la résistance aux macrolides au sein des échantillons positifs à *M. genitalium*.

Les 92 échantillons avec un résultat interprétable correspondaient à 75 patientes :

- 62 patientes avec des souches de *M. genitalium* sensibles aux macrolides.
- 13 patientes avec des souches de *M. genitalium* résistantes aux macrolides.

La prévalence de la résistance aux macrolides s'élevait donc à **17,33% (13/75)**.

L'identification exacte de la mutation a été réalisée par séquençage de la région cible. Nous avons ainsi identifié :

- la mutation A2058G dans 2 échantillons.
- la mutation A2059G dans 14 échantillons.
- la mutation A2062T dans 3 échantillons.

Si l'on raisonne en termes de nombre de patientes (Tableau 16) :

- 6 patientes avaient une souche mutée au niveau vaginal et anal, la même mutation ayant été identifiée dans chacun des sites.
- 4 patientes avaient une souche mutée uniquement au niveau vaginal.
- 3 patientes avaient une souche mutée uniquement au niveau anal.

Tableau 16 : Mutations de résistance identifiées au sein de l'ARNr 23S.

Patiente	Prélèvement	PCR TaqMan	PCR FRET	Séquençage
Patiente 19	Vaginal	Positive	A2058G/A2059G	A2059G
	Rectal	Positive	A2058G/A2059G	A2059G
Patiente 29	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Positive	ND	A2059G
Patiente 32	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Positive	ND	A2059G
Patiente 63	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Positive	ND	A2059G
Patiente 85	Vaginal	Positive	ND	A2062T
	Rectal	Positive	ND	A2062T
Patiente 93	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Positive	ND	A2059G
Patiente 30	Vaginal	Positive	A2058G/A2059G	A2059G
	Rectal	Négative	-	-
Patiente 42	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Négative	-	-
Patiente 60	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Positive	ND	ND
Patiente 84	Vaginal	Positive	ND	A2059G
	Rectal	Positive	WT	WT
Patiente 7	Vaginal	-	-	-
	Rectal	Positive	A2058G/A2059G	A2058G
Patiente 91	Vaginal	Négative	-	-
	Rectal	Positive	ND	A2062T
Patiente 76	Vaginal	Positive	ND	ND
	Rectal	Positive	ND	A2058G

La prévalence de la résistance aux macrolides s'élevait à **17,33% (13/75)**.

La mutation la plus fréquemment rencontrée était la mutation **A2059G**.

V. Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones

1. Recherche de mutations au sein du gène *parC*

Nous avons recherché des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones dans le gène *parC* par PCR puis séquençage de la région cible.

Un résultat interprétable a été obtenu pour 80 échantillons (Figure 18) :

- 6 présentaient une mutation associée à la résistance aux fluoroquinolones.
⇒ 5 échantillons vaginaux et un échantillon ano-rectal.
- 74 présentaient une séquence nucléotidique identique à celle d'une souche sauvage.
⇒ 49 échantillons vaginaux et 25 échantillons ano-rectaux.

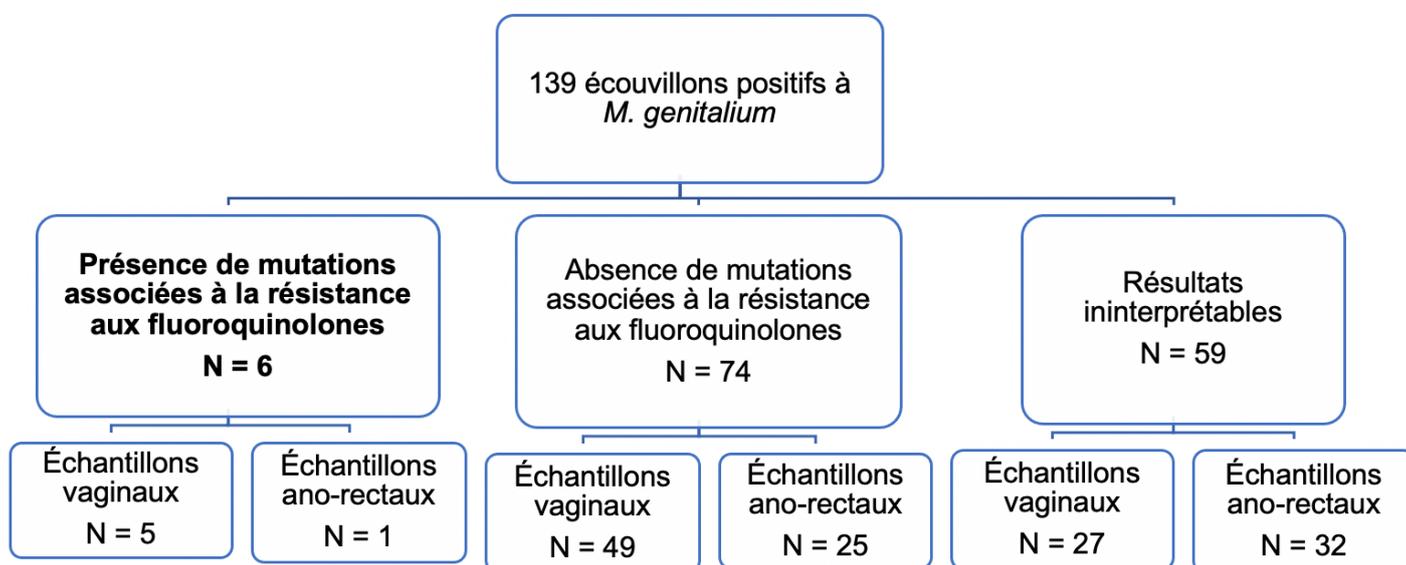


Figure 18 : Résultats de la recherche de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones dans le gène *parC* au sein des échantillons positifs à *M. genitalium*.

Les 80 échantillons avec un résultat interprétable correspondaient à 69 patientes :

- 63 patientes avec des souches de *M. genitalium* sensibles aux fluoroquinolones.
- 6 patientes avec des souches de *M. genitalium* résistantes aux fluoroquinolones.

La mutation Ser(83)Ile a été identifiée dans cinq échantillons et la mutation Asp(87)Tyr dans un seul échantillon (Tableau 17).

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des mutations de résistance identifiées au sein de la protéine ParC.

Patiente	Prélèvement	PCR TaqMan	PCR <i>parC</i>	Séquençage
Patiente 32	Vaginal	Positive	Positive	Ser83(80)Ile
	Rectal	Positive	Positive	Non déterminé
Patiente 86	Vaginal	Positive	Positive	Ser83(80)Ile
	Rectal	Négative	-	-
Patiente 70	Vaginal	Positive	Positive	Ser83(80)Ile
	Rectal	Négative	-	-
Patiente 75	Vaginal	Positive	Positive	Ser83(80)Ile
	Rectal	Négative	-	-
Patiente 96	Vaginal	Positive	Positive	Asp87(84)Tyr
	Rectal	Positive	Positive	WT
Patiente 21	Vaginal	Positive	Positive	WT
	Rectal	Positive	Positive	Ser83(80)Ile

Il a également été retrouvé la mutation Glu124(122)Lys chez une patiente au niveau vaginal mais celle-ci n'est pas associée à un profil de résistance aux fluoroquinolones, la souche a donc été considérée sauvage.

Aucune patiente ne possédait de souche de *M. genitalium* présentant une mutation de résistance aux fluoroquinolones à la fois au niveau vaginal et rectal.

2. Recherche de mutation au sein du gène *gyrA*

L'amplification et le séquençage du gène *gyrA* ont été réalisés pour les 80 échantillons ayant un résultat interprétable pour le gène *parC*.

Un résultat interprétable a été obtenu pour 23 échantillons et tous présentaient une séquence nucléotidique du gène *gyrA* identique à celle d'une souche sauvage.

La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones était de **8,7% (6/69)**.

La mutation la plus fréquemment rencontrée était la mutation **Ser(83)Ile** au sein de la protéine ParC.

Aucune mutation au sein du gène *gyrA* n'a été identifiée.

Une seule patiente (Patiente 32) a présenté une souche à la fois résistante aux macrolides et aux fluoroquinolones :

- Au niveau vaginal, nous avons retrouvé la mutation A2059G, la mutation Ser83Ile et aucune mutation au sein du gène *gyrA*.
- Au niveau ano-rectal, nous avons retrouvé la mutation A2059G. Les séquences nucléotidiques des gènes *parC* et *gyrA* étaient ininterprétables.

DISCUSSION

Nous avons déterminé la prévalence de l'infection à *M. genitalium* au sein de la cohorte Chlazidoxy. Cette cohorte inclut des femmes à risque d'IST, qui présentent toutes une infection vaginale à *C. trachomatis*. Ainsi, nous avons montré que la prévalence de l'infection à *M. genitalium* est de 23,07% (102/442). Plus précisément, 8,4% (37/442) des femmes présentaient une infection vaginale et anale, 10% (44/442) uniquement une infection vaginale et 4,75% (21/442) uniquement une infection anale.

Dans notre étude, la prévalence de l'infection vaginale et anale à *M. genitalium* s'élève respectivement à 18,3% (81/442) et à 13,1% (58/442). Ces chiffres sont plus élevés que ceux rapportés par ceux de Lillis *et al.* avec une prévalence de l'infection vaginale et anale respectivement de 16,3% (65/400) et 4,3% (17/398) [51]. De même, chez des femmes sud-africaines, *M. genitalium* a été détecté chez 8,7% (52/601) des patientes au niveau vaginal et 2,7% (16/601) au niveau rectal [19]. En revanche, nos résultats concordent avec ceux de deux études américaines, qui ont rapporté une prévalence de l'infection vaginale à *M. genitalium* allant de 10,3% (12/116) à 20% (10/50) et une prévalence de l'infection ano-rectale allant de 6,7% (7/105) à 22% (11/50) [18][20]. Enfin, à l'île de la Réunion, une étude menée entre 2017 et 2018 chez des femmes consultant dans un centre de dépistage des IST a montré une prévalence de l'infection vaginale de 5,3% (60/1126) et de 2,2% (3/134) au niveau ano-rectal [52].

Dans notre travail, un tiers des patientes (37/102) ont présenté à la fois une infection vaginale et anale à *M. genitalium*. Ceci est également décrit dans la littérature, mais avec des prévalences bien plus élevées, allant de 52,9% (9/17) à 65% (8/13) [18][53].

Deux tiers des patientes ayant une infection anale à *M. genitalium* ne rapportaient pas de rapports sexuels ano-rectaux. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans d'autres études [18]. La prévalence élevée de l'infection anale en l'absence de rapports sexuels ano-rectaux rapportés par les patientes pose question. Comme pour *C. trachomatis*, une hypothèse pourrait être une auto-inoculation entre les deux sites du fait de leur proximité chez la femme. Cette hypothèse est confortée par nos résultats de tests de résistance aux macrolides, qui montrent les mêmes mutations dans le vagin et l'anus chez une même patiente, à l'exception d'un cas.

Le typage moléculaire ou le séquençage de génome de *M. genitalium* est nécessaire pour confirmer que les souches dans des sites anatomiques distincts sont identiques.

Il est également important de noter que nos techniques TAAN détectent les acides nucléiques de la bactérie, que celle-ci soit vivante ou morte. Il serait intéressant de réaliser une technique de PCR permettant d'étudier la viabilité de la bactérie à partir d'échantillons ano-rectaux.

Nous avons observé que les charges bactériennes de *M. genitalium* étaient significativement supérieures au niveau vaginal par rapport au niveau anal, ce qui est en accord avec les données de la littérature [20]. Cette même étude a rapporté une charge bactérienne significativement plus élevée dans les échantillons contenant une souche mutée *versus* ceux contenant une souche sauvage, ce qui n'est pas le cas dans notre travail.

Dans Chlazidoxy, les patientes ont été incluses dans des CeGIDD et des centres d'orthogénie. Nous avons montré que la prévalence de l'infection à *M. genitalium* varie de 13,4% à 37,3% selon le CeGIDD participant, et de 10,4% à 68,4% selon le centre d'orthogénie. Dans la littérature, au sein d'une cohorte de 302 patientes consultant dans un centre de dépistage des IST et présentant une infection vaginale, 7,3% (22/302) des patientes étaient également positives à *M. genitalium* [21]. Chez des patientes consultant pour une IVG, 656 présentaient une infection vaginale à *C. trachomatis*, parmi lesquelles 10,1% (66/656) étaient également positives à *M. genitalium* [54].

Concernant la résistance aux antibiotiques, nous avons montré que 17,3% (13/75) des patientes étaient infectées par une souche de *M. genitalium* résistante aux macrolides. La prévalence de la résistance aux macrolides au niveau vaginal était 16,4% (10/61) *versus* 29% (9/31) au niveau ano-rectal. Les données récentes de la littérature montrent une prévalence de résistance chez les femmes plus élevée, variant de 21,7% à 53% [21][20][55]. Une étude réalisée dans un hôpital du sud-ouest des États-Unis dans une cohorte de 719 femmes enceintes se présentant pour un suivi de grossesse a montré que 30,8% de souches de *M. genitalium* présentaient une mutation de résistance aux macrolides, au niveau vaginal [56]. Dans une étude américaine, l'ensemble des échantillons ano-rectaux et 90% des échantillons vaginaux analysés avaient une souche de *M. genitalium* résistante aux macrolides [18]. Aux Pays-Bas, toujours chez des femmes, la prévalence de la résistance aux macrolides au niveau vaginal était de 55,7% et au niveau anal de 59,2% [57].

Dans notre cohorte, environ la moitié de nos patientes présentait à la fois une infection vaginale et anale, et la même mutation a été identifiée dans chacun des sites anatomiques. Ceci est concordant avec les résultats de l'étude de Khosropour *et al.*, dans laquelle 65% des patientes présentaient une infection vaginale et anale avec une mutation identique dans chaque échantillon [18].

La résistance aux fluoroquinolones est beaucoup plus faible dans notre étude, avec une prévalence 8,7% (6/69), correspondant à cinq échantillons vaginaux et un seul échantillon ano-rectal. Ces résultats sont concordants avec d'autres travaux réalisés chez des femmes, qui ont montré la présence de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones dans 0% à 14% des échantillons vaginaux et 0% des échantillons ano-rectaux [18][20][56][58]. Seules des mutations au sein de la protéine ParC ont été identifiées, en particulier Ser83Ile.

Ainsi les résistances aux macrolides et aux fluoroquinolones de *M. genitalium* sont de plus en plus préoccupantes et risquent de continuer à augmenter inexorablement avec l'utilisation de ces antibiotiques. La stratégie thérapeutique actuelle recommande un traitement guidé par la recherche préalable de mutations associées à la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* (resistance-guided therapy) [16].

Ce travail sera poursuivi par l'analyse des échantillons collectés six semaines après le début du traitement par azithromycine ou doxycycline. En effet, dans la cohorte Chlazidoxy, la moitié des patientes a reçu de l'azithromycine 1 g en dose unique et l'autre moitié de la doxycycline 100 mg deux fois par jour pendant 7 jours pour le traitement de l'infection à *C. trachomatis*. Un auto-prélèvement vaginal et ano-rectal ont été collectés six semaines après le début du traitement pour vérifier la guérison microbiologique. Comme pour ce travail, nous rechercherons *M. genitalium* dans l'ensemble des échantillons vaginaux et ano-rectaux collectés à la visite de suivi à six semaines. Pour les échantillons positifs à *M. genitalium*, nous rechercherons la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones. Ces résultats nous permettront de calculer l'incidence de l'infection à *M. genitalium* à la semaine 6, de comparer l'efficacité des deux types de traitement sur l'éradication de la bactérie et d'évaluer l'émergence de souches résistantes. Le typage des échantillons positifs à *M. genitalium* permettra également de différencier une infection persistante d'une nouvelle infection. Ce travail fera l'objet de mon mémoire de DES de Biologie Médicale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., Van Etten J., Maniloff J. and Woese C.R., « A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification », *J. Bacteriol.*, vol. 171, p. 6455-6467, 1989.
- [2] Tully J.G., Taylor-Robinson T., Rose D.L., Cole R.M. and Bove J.M., « *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 33, p. 387-396, 1983.
- [3] Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelley J.M., Fritchman J.L., Weidman J.F., Small K.V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T.R., Saudek D.M., Phillips C.A., Merrick J.M., Tomb J-F., Dougherty B.A., Bott K.F., Hu P-C., Lucier T.S., Peterson S.N., Smith H.O., Hutchison III C.A. and Venter J.C., « The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium* », *Science*, vol. 270, p. 397-404, 1995.
- [4] Gnanadurai R. and Fifer H., « *Mycoplasma genitalium*: A Review », *Microbiology*, vol. 166, p. 21-29, 2020.
- [5] McGowin C.L. and Totten P.A., « The unique microbiology and molecular pathogenesis of *Mycoplasma genitalium* », *J. Infect. Dis.*, vol. 216, p. S382-S388, 2017.
- [6] Taylor-Robinson D. and Jensen J.S., « *Mycoplasma genitalium*: from chrysalis to multicolored butterfly », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 24, p. 498-514, 2011.
- [7] Cazanave C., Manhart L.E. and Bébéar C., « *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen », *Médecine Mal. Infect.*, vol. 42, p. 381-392, 2012.
- [8] Horner P.J., and Martin D.H., « *Mycoplasma genitalium* infection in men », *J. Infect. Dis.*, vol. 216, p. S396-S405, 2017.
- [9] Cina M., Baumann L., Egli-Gany D., Halbeisen F.S., Ali H., Scott P. and Low N., « *Mycoplasma genitalium* incidence, persistence, concordance between partners and progression: systematic review and meta-analysis », *Sex. Transm. Infect.*, vol. 95, p. 328-335, 2019.
- [10] Pereyre S., Laurier Nadalié C., Bébéar C., Arfeuille C., Beby-Defaux A., Berçot B., Boisset S., Bourgeois N., Carles M-J., Decré D., Garand A-L., Gibaud S-A., Grob A., Jeannot K., Kempf M., Moreau F., Petitjean-Lecherbonnier J., Prère M-F., Salord H. and Verhoeven P., « *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in France: a point prevalence study in

people screened for sexually transmitted diseases », *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 23, p. 122.e1-122.e7, 2017.

[11] Baumann L., Cina M., Egli-Gany D., Goutaki M., Halbeisen F.S., Lohrer G-R., Ali H., Scott P. and Low N., « Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in different population groups: systematic review and meta-analysis », *Sex. Transm. Infect.*, vol. 94, p. 255-262, 2018.

[12] Sonnenberg P., Ison C.A., Clifton S., Field N., Tanton C., Soldan K., Beddows S., Alexander S., Khanom R., Saunders P., Copas A.J., Wellings K., Mercer C.H. and Johnson A.M., « Epidemiology of *Mycoplasma genitalium* in British men and women aged 16–44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3) », *Int. J. Epidemiol.*, vol. 44, p. 1982-1994, 2015.

[13] Latimer R.L., Shilling H.S., Vodstceil L.A., Machalek D.A., Fairley C.K., Chow E.P.F., Read T. R.H. and Bradshaw C.S., « Prevalence of *Mycoplasma genitalium* by anatomical site in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis », *Sex. Transm. Infect.*, vol. 96, p. 563-570, 2020.

[14] Napierala Mavedzenge S. and Weiss H.A., « Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: a systematic review and meta-analysis », *AIDS*, vol. 23, p. 611-620, 2009.

[15] Napierala Mavedzenge S., Van Der Pol B., Weiss H.A., Kwok C., Mambo F., Chipato T., Van der Straten A., Salata R. and Morrison C., « The association between *Mycoplasma genitalium* and HIV-1 acquisition in African women », *AIDS*, vol. 26, p. 617-624, 2012.

[16] Workowski K.A., Bachmann L.H., Chan P.A., Johnston C.M., Muzny C.A., Park I., Reno H., Zenilman J.M. and Bolan G.A., « Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021 », vol. 70, p. 192, 2021.

[17] Nye M.B., Harris A.B., Pherson A.J. and Cartwright C.P., « Prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection in women with bacterial vaginosis », *BMC Womens Health*, vol. 20, p. 62, 2020.

[18] Khosropour C.M., Jensen J.S., Soge O.O., Leipertz G., Unutzer A., Pascual R., Barbee L.A., Dombrowski J.C., Golden M.R. and Manhart L.E., « High prevalence of vaginal and rectal *Mycoplasma genitalium* macrolide resistance among female sexually transmitted disease clinic patients in Seattle, Washington », *Sex. Transm. Dis.*, vol. 47, p. 321-325, 2020.

[19] Hay B., Dubbink J.H., Ouburg S., Le Roy C., Pereyre S., Van Der Eem L., Morré S.A., Bébéar C. and Peters R.P.H., « Prevalence and macrolide resistance of *Mycoplasma genitalium* in South African women », *Sex. Transm. Dis.*, vol. 42, p. 140-142, 2015.

[20] Xiao L., Waites K.B., Van Der Pol B., Aaron K.J., Hook III E.W. and Geisler W.M., « *Mycoplasma genitalium* infections with macrolide and fluoroquinolone resistance-associated

mutations in heterosexual African American couples in Alabama », *Sex. Transm. Dis.*, vol. 46, p. 18-24, 2019.

[21] Harrison S.A., Olson K.M., Ratliff A.E., Xiao L., Van Der Pol B., Waites K.B. and Geisler W.M., « *Mycoplasma genitalium* coinfection in women with *Chlamydia trachomatis* infection: », *Sex. Transm. Dis.*, vol. 46, p. e101-e104, 2019.

[22] Blanchard A. and Bébéar C., « The evolution of *Mycoplasma genitalium* », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1230, p. E61-E64, 2011.

[23] Chrisment D., Machelart I., Wirth G., Lazaro E., Greib C., Pellegrin J-L., Bébéar C. and Peuchant O., « Reactive arthritis associated with *Mycoplasma genitalium* urethritis », *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 77, p. 278-279, 2013.

[24] Yoshida T. Deguchi T., Ito M., Maeda S-I., Tamaki M. and Ishiko H., « Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, p. 1451-1455, 2002.

[25] Soni S., Horner P., Rayment M., Pinto-Sander N., Naous N., Parkhouse A., Bancroft D., Patterson C. and Fifer H., « British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Mycoplasma genitalium* (2018) », *Int. J. STD AIDS*, vol. 30, p. 938-950, 2019.

[26] Jensen J.S., Cusini M., Gomberg M. and Moi H., « 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections », *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 30, p. 1650-1656, 2016.

[27] Brun J-L., Castan B., de Barbeyrac B., Cazanave C., Charvériat A., Faure K., Mignot S., Verdon R., Fritel X. and Graesslin O., « Pelvic inflammatory diseases: Updated French guidelines », *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.*, vol. 49, p. 101714, 2020.

[28] Machalek D.A., Tao Y., Shilling H., Jensen J.S., Unemo M., Murray G., Chow E.P.F., Low N., Garland S.M., Vodstrcil L.A., Fairley C.K., Hocking J.S., Zhang L. and Bradshaw C.S., « Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis », *Lancet Infect. Dis.*, vol. 20, p. 1302-1314, 2020.

[29] Bébéar C.M., de Barbeyrac B., Pereyre S. and Bébéar C., « Mycoplasmes et chlamydiae : sensibilité et résistance aux antibiotiques », *Rev. Fr. Lab.*, p. 77-85, 2008.

[30] Vázquez-Laslop N., Mankin A.S., « How Macrolide Antibiotics Work », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, p. 668-684, 2018.

[31] Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A. and Piddock L.J.V., « Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success », *Trends*

Microbiol., vol. 22, p. 438-445, 2014.

[32] Van Der Schalk T.E., Braam J.F. and Kusters J.G., « Molecular basis of antimicrobial resistance in *Mycoplasma genitalium* », *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 55, p. 105911, 2020.

[33] Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B. and Steitz T.A., « The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution », *Sci. AAAS*, vol. 289, p. 905-920, 2000.

[34] Chriment D., Charron A., Cazanave C., Pereyre S. and Bébéar C., « Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in France », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, p. 2598-2601, 2012.

[35] Touati A., Peuchant O., Jensen J.S., Bébéar C. and Pereyre S., « Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, p. 1549-1555, 2014.

[36] Le Roy C., Bébéar C., and Pereyre S., « Clinical evaluation of three commercial PCR assays for the detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 58, 2020.

[37] Le Roy C., Bébéar C. and Pereyre S., « Performance of three commercial molecular diagnostic assays for the simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance », *J Clin Microbiol*, 2021.

[38] Murray G.L., Bradshaw C.S., Bissessor M., Danielewski J., Garland S.M., Jensen J.S., Fairley C.K. and Tabrizi S.N., « Increasing macrolide and fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium* », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, p. 809-812, 2017.

[39] Hamasuna R., Le, P.T., Kutsuna S., Furubayashi K., Matsumoto M., Ohmagari N., Fujimoto N., Matsumoto T. and Jensen J.S., « Mutations in ParC and GyrA of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains », *Plos One*, vol. 13, 2018.

[40] Le Roy C., Hénin N., Pereyre S. and Bébéar C., « Fluoroquinolone-Resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, p. 1677-1679, 2016.

[41] Berçot B., Charreau I., Rousseau C., Delaugerre C., Chidiac C., Pialoux G., Capitant C., Bourgeois-Nicolaos N., Raffi F., Pereyre S., Le Roy C., Senneville E., Meyer L., Bébéar C. and Molina J-M., « High prevalence and high rate of antibiotic resistance of *Mycoplasma genitalium* infections in men who have sex with men. A sub-study of the ANRS Ipergay PrEP trial », *Clin Infect Dis*, 2020.

[42] Le Roy C., Touati A., Balcon C., Garraud J., Molina J-M., Berçot B., de Barbeyrac B.,

- Pereyre S., Peuchant O. and Bébéar C., « Identification of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma genitalium* potentially associated with tetracycline resistance in vivo but not selected in vitro in *M. genitalium* and *Chlamydia trachomatis* », *J Antimicrob Chemother*, vol. 76, p. 1150-1154, 2021.
- [43] Read T.R.H., Fairley C.K., Murray G.L., Jensen J.S., Danielewski J., Worthington K., Doyle M., Mokany E., Chow E.P.F., Garland S.M. and Bradshaw C.S., « Outcomes of resistance-guided sequential treatment of *Mycoplasma genitalium* infections: a prospective evaluation », *Clin. Infect. Dis.*, vol. 68, p. 554-560, 2019.
- [44] Horner P., Ingle S.M., Garrett F., Blee K., Kong F., Muir P. and Moi H., « Which azithromycin regimen should be used for treating *Mycoplasma genitalium* ? A meta-analysis », *Sex. Transm. Infect.*, vol. 94, p. 14-20, 2018.
- [45] Paukner S., Gruss A. and Jensen J.S., « *In Vitro* activity of lefamulin against sexually transmitted bacterial pathogens », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, 2018.
- [46] Peuchant O., Lhomme E., Krêt M., Ghezzoul B., Roussillon C., Bébéar C., Perry F., de Barbeyrac B. and the Chlazidoxy study group, « Randomized, open-label, multicenter study of azithromycin compared with doxycycline for treating anorectal *Chlamydia trachomatis* infection concomitant to a vaginal infection (CHLAZIDOXY study): », *Medicine (Baltimore)*, vol. 98, 2019.
- [47] Haute Autorité de Santé, « Méthodes contraceptives : Focus sur les méthodes les plus efficaces disponibles ». 2013. [En ligne]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-03/synthese_methodes_contraceptives_format2clics.pdf
- [48] Mouchel-Viehl E., « Utilisation de la Q-PCR pour analyser des données de CHIP ou de MeDIP ». juin 2012. http://genetique.snv.jussieu.fr/doc2012/QPCR%20FPepigenetique_juin2012.pdf
- [49] Jensen J.S., Björnelius E., Dohn B. and Lidbrink P., « Use of TaqMan 5' 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. 683-692, 2004.
- [50] Shimada Y., Deguchi T., Nakane K., Masue T., Yasuda M., Yokoi S., Ito S-I., Nakano M., Ito S and Ishiko H., « Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance », *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 36, p. 255-258, 2010.
- [51] Lillis R.A., Nsuami M.J., Myers L. and Martin D.H., « Utility of urine, vaginal, cervical,

and rectal specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* in women », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, p. 1990-1992, 2011.

[52] Begnis R., « Prevalence and risk factors of *Mycoplasma genitalium* infection in patients attending a sexually transmitted infection clinic in Reunion Island: a cross-sectional study (2017–2018) », p. 5, 2021.

[53] Han Y., Yin P-Y., Liu J-W., Chen K., Zhu B-Y., Zhou K., Shi M-Q., Xu W-Q., Jhaveri T.A. and Chen X-S., « Rectal *Mycoplasma genitalium* in patients attending sexually transmitted disease clinics in China: an infection that cannot be ignored », *Infect. Drug Resist.*, p. 7, 2021.

[54] Shilling H.S., Garland S.M., Costa A-M., Marceglia A., Fethers K., Danielewski J., Murray G., Bradshaw C., Vodstrcil L., Hocking J.S., Kaldor J., Guy R. and Machalek D.A., « *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* prevalence and associated factors among women presenting to a pregnancy termination and contraception clinic, 2009–2019 », *Sex. Transm. Infect.*, 2021.

[55] Broad C.E., Furegato M., Harrison M.A., Pond M.J., Tan N., Okala S., Fuller S.S., Harding-Esch E.M. and Sadiq S.T., « High prevalence of coinfection of azithromycin-resistant *Mycoplasma genitalium* with other STIs: a prospective observational study of London-based symptomatic and STI-contact clinic attendees », *Sex. Transm. Infect.*, vol. 97, p. 63-68, 2021.

[56] Stafford I.A., Hummel K., Dunn J.J., Muldrew K., Berra A., Kravitz E.S., Gogia S., Martin I. and Munson E., « Retrospective analysis of infection and antimicrobial resistance patterns of *Mycoplasma genitalium* among pregnant women in the southwestern USA », *BMJ Open*, vol. 11, 2021.

[57] Braam J.F., Hetem D.J., Vergunst C.E., Wessel S.K., Van Rooijen M.S., Nijhuis R.H.T., Van Der Loeff M.F.S., Van Dam A.P. and Bruisten S.M., « Evaluating the prevalence and risk factors for macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* using a newly developed qPCR assay », *Plos One*, vol. 15, 2020.

[58] De Baetselier I., Kenyon C., Berghe W.V., Smet H., Wouters K., Van Den Bossche D., Vuylsteke B. and Crucitti T., « An alarming high prevalence of resistance-associated mutations to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium* in Belgium: results from samples collected between 2015 and 2018 », *Sex. Transm. Infect.*, vol. 97, p. 297-303, 2021.

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. »

Résumé

Nous avons évalué la prévalence de l'infection à *M. genitalium* au sein des échantillons vaginaux et ano-rectaux de la cohorte Chlazidoxy, incluant des femmes ayant une infection vaginale à *C. trachomatis*. Au total, 23,07% (102/442) des patientes présentaient une infection à *M. genitalium*, avec une prévalence au niveau vaginal de 18,3% (81/442) et de 13,12% (58/442) au niveau anal. Dans un tiers des cas, la bactérie a été détectée dans les deux sites anatomiques analysés. L'étude de la charge bactérienne a montré que celle-ci était significativement plus importante dans les échantillons vaginaux par rapport aux échantillons anaux. Parmi les échantillons positifs à *M. genitalium*, 17,3% (13/75) étaient résistants aux macrolides et 8,7% (6/69) résistants aux fluoroquinolones. La mutation A2059G au sein du gène de l'ARNr 23S et la mutation Ser83Ile au sein de la protéine ParC, associées respectivement à la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones, ont été les plus fréquemment identifiées. Une seule patiente présentait une infection avec une souche résistante à ces deux classes d'antibiotiques.

Mots-clefs : *M. genitalium*, prélèvement vaginal, prélèvement anal, charge bactérienne, macrolides, fluoroquinolones.

Summary

We evaluated the prevalence of *M. genitalium* in vaginal and anorectal samples from the Chlazidoxy cohort. In this cohort, all women had vaginal *C. trachomatis* infection. A total of 23.07% (102/442) of patients were *M. genitalium*-positive, including 18.3% (81/442) with vaginal *M. genitalium* and 13.12% (58/442) with anal *M. genitalium*. One third of women had concurrent vaginal and anal *M. genitalium*. Bacterial load was significantly higher in the vaginal samples than in the anal samples. Among *M. genitalium*-positive samples, 17.3% (13/75) were resistant to macrolides and 8.7% (6/69) were resistant to fluoroquinolones. The A2059G mutation in the rRNA 23S gene and the Ser83Ile mutation in the protein ParC, associated with macrolide and fluoroquinolone resistance, respectively, were the most frequently identified. Only one patient had an infection with a strain resistant to these two classes of antibiotics.

Key words : *M. genitalium*, vaginal swabs, anal swabs, bacterial load, macrolides, fluoroquinolones.