

INTRODUCTION

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes connus à ce jour capables de se multiplier en dehors d'une cellule vivante, et donc doué d'une vie indépendante. L'absence de paroi cellulaire et la faible taille de leur génome (600-800 Kb, particulièrement riche en bases adénine et thymine) sont les principales caractéristiques de cette famille(36). Actuellement, seize espèces de mycoplasmes susceptibles d'être isolées chez l'homme ont été répertoriées (94). Parmi les mycoplasmes que l'on peut retrouver au niveau du tractus urogénital de l'homme, cinq d'entre eux ont été incriminés dans des pathologies humaines. *Mycoplasma penetrans*, récemment découvert dans les urines de patients infectés par le virus HIV (59), possède la particularité d'être hautement cytopathogène pour une série de lignées cellulaires eucaryotes (94). *Mycoplasma fermentans* est rarement isolé dans le tractus urogénital de l'homme (91) et ne semble pas jouer un rôle en pathologie urogénitale (94). Toutefois, chez des sujets immunodéprimés, on a localisé *M. fermentans* dans d'autres sites, principalement au niveau du liquide articulaire (65). En outre, *M.fermentans* a été mis en évidence dans le tissu pulmonaire de patients adultes atteints de détresse respiratoire et dont l'immunité cellulaire n'était pas compromise (12, 61).

C'est en 1981 que Taylor-Robinson et al. (96) découvre *Mycoplasma genitalium* dans l'écoulement urétral chez deux patients homosexuels souffrant d'urétrite non gonococcique. Par la suite, d'autres travaux ont étudié l'implication de *M. genitalium* dans la pathologie du tractus urogénital (93) ou l'inflammation des organes pelviens (67). Actuellement, beaucoup d'aspects de la distribution et de la pathogénicité de *M. genitalium* restent sans réponse.

La colonisation des tractus respiratoire et génital par *Mycoplasma hominis* s'effectue le plus souvent pendant ou peu de temps après la naissance. Cette présence est souvent transitoire et *M. hominis* tend à disparaître après l'âge de

deux ans. La ré- acquisition de *M. hominis* dans le tractus génital inférieur dépend des contacts sexuels et plus spécifiquement du nombre de partenaires sexuels (62, 63). Les taux de portage peuvent varier de 1 à 5% parmi les hommes asymptomatiques et de 30 à 70% parmi les femmes asymptomatiques (46, 95).

Comme *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum* peut coloniser le nouveau-né in utero ou à la naissance (78). La persistance d'*U. urealyticum* dans le tractus respiratoire supérieur et dans le tractus génital de l'homme diminue après la naissance, mais 20% des filles avant la puberté possèdent encore ce micro-organisme dans leur tractus génital inférieur(47). Après la puberté, l'importance du portage dépend de l'activité sexuelle (62, 63). On retrouve *U. urealyticum* dans le vagin de 40 à 80% des femmes asymptomatiques et dans l'urètre de 5 à 20% des hommes asymptomatiques (94, 46).

Et cependant les espèces le plus souvent retrouvées et incriminées en routine sont *M.hominis* et *U.urealyticum* (14). Les recherches de mycoplasmes auraient donc pour objectifs

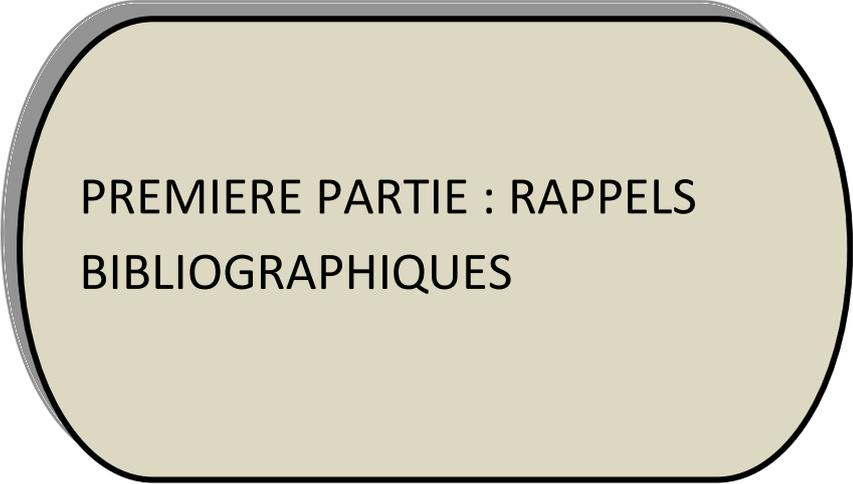
- La distinction de leur présence en situation de pathogénicité d'une simple présence à l'état commensal.
- L'étude de la sensibilité aux antibiotiques, afin de déterminer si un traitement spécifique est nécessaire, étant donné la survenue des cas de résistance de plus en plus rapportés.

Compte-tenu de leur rôle avéré dans certaines infections urogénitales(7) chez l'homme et/ou la femme mais aussi de leur implication dans les infections néonatales, il importe d'affiner les méthodes utilisées pour leur isolement et leur identification mais aussi d'apporter une réponse aux questions du choix des antibiotiques à adopter pour la mise en œuvre d'une meilleure thérapie.

C'est dans ce contexte que des études précédentes ont été menées sur la Microméthode CSB Myco, laquelle a montré des résultats bien corrélés aux méthodes classiques d'identification et de sensibilité déjà existantes, bien que le problème de la standardisation de l'inoculum subsistait.

Ce travail envisage donc via la Microméthode CSB Myco :

- La standardisation de l'inoculum appliqué aux méthodes d'isolements des mycoplasmes urogénitaux, en vue d'une meilleure identification d'espèce.
- La standardisation de l'inoculum pour une meilleure mise en œuvre de l'étude de la sensibilité in vitro de ces micro organismes notamment *M.hominis* et *U.urealyticum* ; les espèces le plus souvent incriminées en pathologies humaines.



PREMIERE PARTIE : RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I- HISTORIQUE

Les mycoplasmes sont des micro-organismes ubiquitaires connus dans le règne animal depuis la fin du XIX^{ème} siècle. (5)

C'est vers 1843 que fut reconnue pour la première fois une pleuropneumonie contagieuse des bovidés. Pasteur suggéra que l'agent responsable était une bactérie ultra microscopique.

1898 : Nocard et Roux découvrent un agent "filtrable" responsable d'une péripneumonie contagieuse des bovidés avec épanchement pleural. Ils isolent le germe responsable sur milieux artificiels et lui donnent le nom *d'Asterococcus mycoïdes* (10,45).

Puis de nombreux autres organismes voisins ont été décrits sous le nom de PPLO (pleuro pneumonie like organisms). (3)

1900 : Du jardin Beaumetz cultive ce micro-organisme sur milieux solides et décrit l'aspect des colonies.

1910 : Borrel et Bordet découvrent les aspects morphologiques.

1923 : Baidge et Donatien isolent l'agent responsable de l'agalactie des ovins et des caprins. Ce germe présente des propriétés bactériologiques comparables à celles décrites pour *Asterococcus mycoïdes* (16).

1929 : Nowack propose le terme de mycoplasme pour rendre compte de leur aspect pseudomycélien (71).

1935 : Madame Kleine-berger Nobel (55) isole au Lister Institut des micro-organismes "parasites" de culture d'un streptobacille dont les colonies présentaient

l'aspect des colonies de mycoplasmes. Les parasites étaient des formes de bactéries déficientes dites forme "L" ou PPLO (45).

1936 : Laidlaw et Elford isolent les Acholéplasmés : espèces saprophytes.

1937 : Dienes et Esdall isolent le premier mycoplasme humain d'un abcès de la glande de Bartholin (32).

1940 : Dienes retrouve ces organismes dans les sécrétions cervicales des femmes ayant pour la plupart une métrite ou une cervicite.

1942 : Smith isolait à nouveau ces micro-organismes du col utérin et à partir d'une sécrétion urétrale d'un homme ayant une urétrite non gonococcique et une arthrite (84).

1944 : Eaton et al. isolent à partir d'expectorations filtrées de patients présentant une pneumonie atypique primitive un agent qui peut être obtenu en culture sur œuf de poule embryonné. L'agent responsable fut nommé agent "d'EATON" qui était responsable d'affections respiratoires humaines avec une réponse sérologique spécifique et n'était pas de nature virale (37).

1954 : Shepard isole à partir des voies génito-urinaires humaines des mycoplasmes formant des colonies de petite taille les souches "T" (tiny = minuscule) appelées aujourd'hui *Ureaplasma* (87).

1962 : Chanock, Hayflick et Barile cultivent pour la première fois en milieu acellulaire *Mycoplasma pneumoniae* impliqué dans la pneumonie atypique primitive (24).

1972 : Bove et al. isolent des mycoplasmes spiralés : les spiroplasmés responsables d'une maladie des agrumes : le stubborn (10)

1981 : Tully décrit *Mycoplasma genitalium* isolé d'urétrite non gonococcique mais ses propriétés sont proches de celles de *Mycoplasma pneumoniae* d'autant plus qu'il a récemment été découvert d'un prélèvement respiratoire. Son pouvoir pathogène reste à déterminer (6,45).

Chez les mammifères plus de 40 espèces ont été isolées dont beaucoup sont responsables de pneumonie, de péricardite, d'arthrites, d'urétrites, d'encéphalites.

Cette colonisation importante tant chez l'homme que chez l'animal pose très rapidement le problème de la réalité étiopathogénique. En effet, actuellement seul *Mycoplasma pneumoniae* est reconnu comme pathogène indiscutable pour l'homme.

II- CLASSIFICATION

Etant les plus petits procaryotes capables de réplication de façon autonome en milieu acellulaire, les mycoplasmes appartiennent à la classe des Mollicutes (peau molle) ou Ténéricutes.

L'ordre des Mycoplasmatales comprend une seule famille :

les Mycoplasmatacae.

Cette famille est caractérisée par son exigence en stérols. Elle est constituée de deux genres :

- Mycoplasma,
- Ureaplasma,

Le genre Mycoplasma est constitué de 100 espèces dont 13 espèces humaines (tableau I).

Le genre *Ureaplasma* est constitué de six espèces dont une seule est pathogène pour l'homme : *Ureaplasma urealyticum*. Sa localisation principale est urogénitale.

L'ordre des Entomoplasmatales comprend deux familles : les Entomoplasmataceae et Spiroplasmataceae.

La famille des Entomoplasmataceae qui colonise les plantes et les insectes est constituée de deux genres :

- Entomoplasma ;
- Mesoplasma.

La famille des Spiroplasmataceae comprend un seul genre : *Spiroplasma* avec trois espèces dont *Spiroplasma citrii*.

L'ordre des Acholeplasmatales comprend une seule famille : Acholeplasmataceae avec un seul genre Acholeplasma.

L'ordre des Anaeroplasmatales comprend une famille Anaeroplasmataceae constituée de deux genres :

- Anaeroplasma avec deux espèces ;
- Asteroleplasma.

Il existe un genre à position taxonomique incertaine : le genre *Thermoplasma* avec une seule espèce.

Tableau I : Les différentes espèces humaines de Mycoplasma [72, 92]

ESPECES	LOCALISATION PRINCIPALE	POUVOIR PATHOGENE	PREMIER ISOLEMENT
<i>Mycoplasma buccale</i>	Respiratoire	-	1965
<i>Mycoplasma faucium</i>	Respiratoire	-	1969
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Urogénitale, sanguine	±	1952
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Urogénitale	±	1981
<i>Mycoplasma hominis</i>	Respiratoire, Urogénitale	+	1937
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	Respiratoire	-	1974
<i>Mycoplasma pirum</i>	Sanguine	±	1968
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Respiratoire	+	1962
<i>Mycoplasma primum</i>	Respiratoire	-	1955
<i>Mycoplasma orale</i>	Respiratoire	-	1964
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Respiratoire	-	1953
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	Génitale	±	1991
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Urogénitale	±	1991

III- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

III-1 Morphologie et structure (5,70 ,77)

Les mycoplasmes représentent un groupe unique de micro- organismes présentant des caractéristiques originales telles que l'absence de paroi, la faible taille du génome particulièrement riche en base adénine-thymine (2) ; ce sont en outre des cellules simples, ayant la forme d'un coccus. Ils sont difficiles à observer au microscope optique même en contraste de phase, c'est au microscope électronique que la morphologie a été étudiée.

Les mycoplasmes présentent un grand pléiomorphisme : il existe des formes allongées, fusiformes ou filamenteuses. Leur diamètre est de 300 nm environ. Cette taille leur permet de passer à travers les filtres de porosité de 450 nm.

Cette absence de paroi leur confère les propriétés suivantes :

- Une sensibilité à la pression osmotique du milieu, au pH, aux variations de température et aux agents tensio-actifs. La pression osmotique est maintenue par le chlorure de sodium des différents milieux de culture.
- Une résistance aux antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi comme les bêta-lactamines.
- Une grande plasticité.

Les mycoplasmes sont entourés d'une membrane plasmique à trois feuilletts. Cette membrane est constituée de lipides, protéines, polysaccharides et de lipopolysaccharides. Ils possèdent également de nombreux ribosomes, un ADN filamenteux au centre et parfois des corps dont on ne connaît pas la nature exacte.

III-2 Mode de division

Comme les bactéries, ils peuvent se multiplier sur des milieux acellulaires et produire leur propre énergie mais les mycoplasmes sont beaucoup plus exigeants. Ils ont un besoin absolu en cholestérol (sauf dans le cas du genre *Acholéplasma*) et en précurseurs d'acides nucléiques (purines, pyrimidines, nucléosides) (13).

La multiplication semble bien être une division binaire classique. La courbe de croissance en milieu liquide est identique à celle obtenue pour une bactérie. Le cycle de multiplication de *Mycoplasma pneumoniae* est de 5 à 6 heures (31)

III-3 Type respiratoire

C'est la microaérophilie, voire l'anaérobiose pour la majorité des espèces; cependant certaines telles que *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasma hominis* peuvent croître en aérobiose ; une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂ favorisent leur croissance (3,45).

III-4 Caractères biochimiques (31, 33,70)

Les mycoplasmes possèdent des caractères biochimiques communs. Leur système de transport d'électrons est relativement simple. Leurs exigences nutritives le plus souvent importantes nécessitent des milieux complexes et enrichis.

Certains caractères biochimiques permettent de les différencier les uns des autres (tableau II).

Ils possèdent des enzymes nécessaires à leur propre synthèse et peuvent donc se multiplier en l'absence de cellules vivantes. Bien qu'ils soient capables de

synthétiser les nucléides, un apport en peptides préformés est indispensable à leur métabolisme.

III-4.1 Métabolisme glucidique

Certaines souches utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie ; certaines sont glucidolytiques d'autres non. Pour les glucidolytiques le produit final de la dégradation est le plus souvent de l'acide lactique pyrrolique et acétique en très faible quantité. Le mannitol, le lactose et le saccharose ne sont jamais fermentés.

III-4.2 Métabolisme lipidique

Tous les mycoplasmes ont un besoin accru en cholestérol non estérifié. Le cholestérol peut être remplacé par du stigmatérol et quelques autres stérols. Le cholestérol (36 % des lipides membranaires) conditionne la stabilité osmotique de la cellule. Il joue donc un rôle structural et sera nécessaire aux échanges à travers la membrane.

Cette présence de cholestérol serait liée à la sensibilité des mycoplasmes à la digitonine. En effet les acholeplasma non exigeants en cholestérol ne sont pas sensibles à la digitonine. Ce caractère est mis en évidence par une technique d'inhibition de la croissance à partir de disque.

Les acides gras nécessaires peuvent être fournis soit liés à la sérum-albumine, soit sous forme d'esters hydrosolubles.

III-4.3 Métabolisme protidique

Les mycoplasmes ne sont pas protéolytiques, en général seules quelques espèces liquéfiant la gélatine peuvent liquéfier également le sérum coagulé ou la caséine.

- arginine : les mycoplasmes exception faite de *Mycoplasma pneumoniae* et *Ureaplasma urealyticum*, dégradent l'arginine avec production d'ammoniac.

Cette propriété constitue leur source majeure d'énergie et un moyen biochimique d'identification.

- urée : seul *Ureaplasma* possède une uréase et dégrade l'urée. C'est la propriété la plus caractéristique d'*Ureaplasma*.

Tableau II : Profil métabolique des principales espèces de mycoplasmes (31)

	Glucose	Arginine	Urée
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma orale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma buccale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma faucium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	-
<i>salivarum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma primum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma genitalum</i>	+	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	+

III-4.4 Activité hémolytique

Ureaplasma possède une bêta hémolysine soluble produite en aérobiose et anaérobiose. Elle hémolyse les hématies de lapin. Elle est absorbée sur les cellules HELA.

Mycoplasma pneumoniae possède une hémolysine soluble de type bêta active sur les hématies de cobaye. Seul *Acholeplasma laidii* donne une hémolyse identique dans les mêmes conditions, les autres mycoplasmes ne donnent qu'une hémolyse incomplète verdâtre et d'apparition retardée.

III-4.5 Autres Caractères

Les mycoplasmes ne produisent ni indole, ni H₂S, ils ne possèdent non plus de nitrate réductase ni d'oxydase mais possèdent une phosphatase, une NAD oxydase, une aminopeptidase, une ATPase, une RNase, une DNase et des nucléases.

III-5 Caractères culturaux

Du fait de leur petit génome, les mycoplasmes ont une capacité de biosynthèse limitée. Les mycoplasmes sont des bactéries exigeantes ; leurs milieux de culture sont complexes et comportent du sérum de cheval ou de poulain et de l'extrait de levure.

Le sérum est non décomplémenté et stérilisé par filtration. Il apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié. Ce cholestérol est incorporé dans la membrane et leur confère une solidité vis à vis de l'environnement.

L'extrait de levure apporte des vitamines et des ions minéraux.

Le milieu de base est constitué d'un macéré de viande, de protéines animales ou végétales, de glucose à 0,1% et de NaCl à 0,5%. Il peut être rendu solide par addition de gélose.

Les milieux adaptés à la croissance de *Mycoplasma hominis* dérivent des milieux de HAYFLICK(26) et des milieux SP₄ (43). Ils présentent un pH ajusté à 7,2 - 7,5 et contiennent de l'arginine, du rouge de phénol et des inhibiteurs des contaminants. Le temps d'incubation est de 1-3 jours (pour obtenir une alcalinisation du milieu par dégradation de l'arginine)

Sur milieu gélosé, après incubation sous atmosphère anaérobie ou sous CO₂, *Mycoplasma hominis* donnent des colonies de 100-300μ de diamètre visibles au microscope optique. Ces colonies présentent l'aspect d'œufs sur le plat.

Les milieux pour les uréaplasmes dérivent du milieu de SHEPARD(92) et contiennent du chlorure de manganèse qui donne aux colonies d'*Ureaplasma urealyticum* une couleur brun-noire. Les colonies sont petites (10-50μ de diamètre), irrégulières et présentent un aspect d'oursin. Le temps de croissance est de 1-4 jour à 37°C en anaérobiose. En revanche, la détection en milieu liquide s'effectue plus rapidement par l'activité uréasique puissante des Uréaplasmes (18-24 heures pour obtenir une alcalinisation du milieu).

III-6 Facteur de virulence (5,22, 72)

Les mycoplasmes possèdent différents mécanismes leur permettant d'exercer leur pouvoir pathogène. Ces mécanismes sont surtout connus dans le cas d'*Ureaplasma urealyticum*.

Parmi ces facteurs favorisant la virulence, on retrouve :

- l'adhérence aux surfaces cellulaires

Les mycoplasmes sont rarement présents à l'état libre dans l'organisme, ils « s'attachent » aux cellules du siège de l'infection (cellules HELA, spermatozoïdes...). Ces micro-organismes sont étroitement associés aux surfaces muqueuses et une adhérence aux surfaces épithéliales conditionnent leur implantation chez un hôte neuf, donc leur virulence.

L'adhérence est un processus réversible lié à la température ; mais difficilement explicable par attraction électrostatique, car les mycoplasmes comme les cellules sont chargées négativement. Il semblerait que la fixation se fasse sur les récepteurs neuraminiques. Ainsi, les mycoplasmes peuvent aussi bien instiller leurs déchets toxiques (H_2O_2 , NH_3 , enzymes) dans la cellule hôte à travers la membrane cellulaire et récupérer le cholestérol et d'autres nutriments de la cellule à leur profit ; créant ainsi une déplétion vitale de la cellule « hôte ».

C'est ainsi que l'adhérence des mycoplasmes aux spermatozoïdes pourrait expliquer une baisse de la fertilité.

- les toxiques produits par les cellules

1) Les produits terminaux du métabolisme cellulaire

- L'eau oxygénée, produit terminal de la respiration des mycoplasmes. Les peroxydes élaborés par le mycoplasme attaquent la membrane cellulaire et provoquent la lyse de l'épithélium. L'organisme réagit par un afflux de polynucléaires qui phagocytent les mycoplasmes.

La muqueuse peut limiter l'infection en produisant des IgA ou de l'interféron.

- L'ammoniac, produit en grande quantité par l'hydrolyse de l'urée ou de l'arginine provoque des altérations cellulaires.

2) Les enzymes

Ureaplasma urealyticum possède des activités enzymatiques variées susceptibles d'intervenir dans son pouvoir pathogène. Il possède également une uréase très puissante, une IgA protéase supposée être un facteur de virulence pouvant dégrader les IgA présentes sur les surfaces et une phospholipase capable de léser les membranes cellulaires.

IV- CARACTERES ANTIGENIQUES

La connaissance des antigènes(Ag) présente un triple intérêt :

- l'identification par inhibition de la croissance métabolique
- le diagnostic direct par la recherche d'Ag dans les produits pathologiques.
- le sérodiagnostic direct sachant qu'il existe des réactions sérologiques croisées entre les différentes espèces de mycoplasmes (3).

Il existe cependant quelques difficultés à la mise en œuvre de ces techniques :

D'une part la nécessité d'obtenir de grandes quantités de culture pour avoir un Ag assez puissant et un titre d'Anticorps(Ac) assez élevé.

D'autre part l'importance d'utiliser des immuno-absorbants pour éliminer les traces de milieux de cultures absorbées sur les mycoplasmes et qui aboutit à une chute du titre d'immuno-sérum (58).

Les immunogènes des mycoplasmes sont des Ag de surface localisés sur la membrane cytoplasmique. Ils sont pour la plupart thermolabiles et sensibles aux enzymes protéolytiques.

Sur le plan de l'immunité, les mycoplasmes sont peu immunogènes, les Ac neutralisants qui inhibent les cultures ou ceux décelés par immuno fluorescence seraient responsables de l'immunité mais n'empêcheraient pas la persistance du germe dans l'organisme.

Au cours des infections, la présence d'Ac spécifiques est rare et leur titre peu élevé (maximum 1/8) d'où leur manque d'intérêt du point de vue diagnostic (33).

Un mycoplasme possède plusieurs constituants antigéniques dont certains sont spécifiques :

Pour *Mycoplasma hominis* et *Mycoplasma fermentans* ces Ag de membrane sont des glycolipides. Le carbohydrate donnant la spécificité à l'haptène (70).

Actuellement 14 sérotypes sont connus pour *Ureaplasma urealyticum* et 7 pour *Mycoplasma hominis*. Des études tendent à montrer que certains sérotypes seraient plus pathogènes que d'autres et seraient reliés à une certaine pathologie. Le sérotype 4 de *Ureaplasma urealyticum* a été rencontré lors d'urétrites gonococciques masculines et les sérotypes N°3, 6, 11, 13 ont été retrouvés au cours d'avortement (6, 23,40).

La question reste néanmoins entière : certains sérotypes sont-ils plus pathogènes que d'autres ? Ou alors est-ce l'association des mycoplasmes à d'autres micro-organismes ou encore la modification des défenses locales ou de l'environnement qui rendent ces sérotypes plus nocifs ou qui modifient la virulence des souches ? (3,40)

V- EPIDEMIOLOGIE

La présence des mycoplasmes dans les voies génitales varie selon de nombreux paramètres dont le sexe, l'âge et le nombre de partenaires.

V-1 Chez le nouveau-né

Les mycoplasmes urogénitaux peuvent être retrouvés au niveau de l'oropharynx, du naso-pharynx et des organes génitaux.

Les germes sont isolés des voies génito-urinaires chez 10-20% des fillettes et 3-5% des garçons. Les nouveau-nés s'infectent à la naissance au moment du passage à travers les voies génitales de la mère. L'infection est en effet moins fréquente après la naissance par césarienne qu'après un accouchement par les voies naturelles. Cette colonisation intéresse aussi bien *Ureaplasma urealyticum* que *Mycoplasma hominis* (de façon moindre pour ce dernier cependant). Ce saprophytisme disparaît avec l'âge, et leur isolement est exceptionnel chez l'enfant avant la puberté.

V-2 Chez l'adolescent : à la puberté

C'est à partir de ce moment de la vie que les mycoplasmes réapparaissent au niveau des voies génitales : les échanges par contact sexuel augmentent la fréquence des sujets colonisés(3).

V-3 Chez l'adulte

V-3.1 Localisation

Chez l'homme, *Ureaplasma urealyticum* est isolé de l'urètre et *Mycoplasma hominis* du prépuce alors que chez la femme, ces deux germes sont rencontrés au niveau du vagin et plus rarement au niveau de l'endocol.

V-3.2 Fréquence d'isolement

Mycoplasma hominis est rencontré à l'état saprophyte dans le tractus génital chez 38% des hommes et 45% des femmes.

Ureaplasma urealyticum fait partie de la flore uro-génitale dans 40-70% des cas, mais prédomine chez la femme. Cependant, il peut parfois être isolé chez 60% des hommes et 80% de femmes issus d'une population à risque suivie ou en consultation pour IST (40,58).

V-3.3 Facteurs favorisants

☞ L'activité sexuelle

Une étude réalisée par Taylor et Robinson (92) rapporte la fréquence des mycoplasmes en fonction du nombre de partenaires sexuels des individus.

Tableau IV : Fréquence des mycoplasmes en fonction du nombre de Partenaires sexuels (52,70)

ESPECES	1 PARTENAIRE		3 PARTENAIRES	
	HOMME	FEMME	HOMME	FEMME
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	19%	38%	45%	75%
<i>Mycoplasma hominis</i>	0%	9%	14%	17%

La fréquence d'isolement des mycoplasmes augmente avec le nombre de partenaires. La femme est plus sensible que l'homme au portage. D'autres

auteurs (10,48) avaient aussi montré que la colonisation des muqueuses génitales par les mycoplasmes augmente avec l'activité sexuelle. Bebear et Latrille (10) ont mis ceci en évidence chez des prostituées(48).

En effet, en l'absence de relations sexuelles, la colonisation du sujet adulte par ces germes demeure très faible (similaire à celle des enfants impubères) (70).

☞ L'état hormonal

Il pourrait exister une influence hormonale car, absents jusqu'à la puberté, les mycoplasmes sont observés à un taux maximal à ce stade. Néanmoins, le seul facteur commun déterminant demeure le niveau de l'activité sexuelle.

Les mycoplasmes sont le plus fréquemment rencontrés chez la femme dans la deuxième partie du cycle menstruel et pendant la grossesse (15)

☞ Les infections vaginales

Les infections bactériennes et les vaginites à *Trichomonas* favorisent la prolifération des mycoplasmes. Dans ce cas, le risque de surinfections à mycoplasmes est multiplié par un facteur 3 à 10. (40)

VI- POUVOIR PATHOGENE

Le rôle pathogène des mycoplasmes génitaux est difficile à affirmer car ces micro-organismes sont observés à l'état commensal dans le tractus génital de nombreux sujets sains (54,92).

Néanmoins *Ureaplasma urealyticum* est présenté comme l'agent d'urétrites non gonococciques (environ 15%) (11) et *Mycoplasma hominis* comme l'agent causal de pyélonéphrites ainsi que de salpingites. Ces mycoplasmes sont également impliqués dans les maladies de la reproduction et dans d'autres infections (70).

Dans une étude, Coprin et Lebrun (27) ont présenté les implications de mycoplasmes uro-génitaux dans différents types d'infections

VI-1 Mycoplasmes et infections du tractus génital chez l'homme

Ureaplasma urealyticum est de loin l'espèce la plus souvent mise en cause dans les infections masculines, mais de plus en plus *Mycoplasma genitalium* est retrouvé associé à des infections telles que les uréthrites non gonococciques (35). Le rôle de *Mycoplasma hominis* reste beaucoup plus aléatoire.

Différents tableaux cliniques peuvent être concernés et la responsabilité de *Ureaplasma urealyticum* varie selon le site. Si son pouvoir pathogène est certain dans les uréthrites non gonococciques(UNG), son implication fait l'objet de controverse dans d'autres affections telles que prostatites et épидидymites. (23)

VI-1.1 Uréthrites non gonococciques

Mycoplasma genitalium est impliqué dans près de 20% des UNG et serait responsable d'uréthrites chroniques (2). Il s'agit d'uréthrites le plus souvent symptomatiques avec présence d'écoulement. On explique ce pouvoir pathogène par le fait qu'il possède des propriétés d'adhésion ; des Anticorps ont notamment pu être mis en évidence chez certains individus. Néanmoins beaucoup d'aspects de la distribution et de la pathogénicité de *M. genitalium* restent sans réponse.

Ureaplasma urealyticum est impliqué dans l'étiologie d'UNG (69, 91,98) ; il est à côté de *Chlamydia trachomatis* un des agents causal de ce type d'infection. On distingue deux types de manifestations cliniques :

- L'urétrite aiguë (5%) : il est difficile de la différencier de l'urétrite aiguë gonococcique, l'incubation est courte (1-3 jours), la sécrétion urétrale est importante, il a même été décrit des formes hémorragiques douloureuses.
- L'urétrite subaiguë est la plus fréquente : la période d'incubation est de 10-60 jours, les urines sont claires. A l'urétroscopie, on a une muqueuse rougeâtre enflammée avec quelques fois des formes trainantes et un œdème du col vésical.

Les résultats observés par différents auteurs varient beaucoup d'une enquête à l'autre. Ford et Bennett(9) ont ainsi isolé *Ureaplasma urealyticum* chez 60 à 70% de sujets atteints d'UNG contre 17 à 20% chez des sujets indemnes d'infections génito-urinaires. Pour Black et Rasmussen, les résultats sont beaucoup plus variables et dépendent des groupes d'individus observés. *Ureaplasma urealyticum* est retrouvé chez 46% des sujets atteints d'UNG contre des taux variant de 25 à 34% selon les groupes témoins d'étude(3,9)

Le rôle du *Mycoplasma hominis* dans les UNG reste très incertain même s'il peut parfois être isolé en quantité non négligeable à partir de prélèvements urétraux.

Le rôle des mycoplasmes génitaux dans les complications d'urétrites, d'arthrites réactionnelles, de syndromes de REITER n'est pas confirmé dans l'état actuel des méthodes de diagnostic en l'absence d'isolement. (6)

VI-1.2 Prostatite aiguë et chronique

Ureaplasma urealyticum serait mis en cause dans quelques cas de prostatites chroniques (11). Certains auteurs, Weidne et al. pour en faire la preuve ont utilisés des techniques de fractionnement des échantillons de prélèvements (17, 102). Ils ont ainsi quantifié les uréaplasmes dans les urines de premier jet, les urines vésicales, les sécrétions prostatiques de même que dans le sperme. Leur

résultat indique que *Ureaplasma urealyticum* peut coloniser la prostate, il ne paraît cependant pas intervenir dans les prostatites aiguës.

VI-1.3 Epididymites

Jalil et al. (52) ont isolé directement *U. urealyticum* de l'épididyme d'un patient atteint d'une orchite-épididymite aiguë, en l'absence de tout autre agent pathogène (Chlamydia, gonocoque). Néanmoins, cette localisation semble très inhabituelle.

VI-2 Mycoplasmes et infections gynécologiques

L'infection chez la femme est asymptomatique et la colonisation du tractus génital est ascendante vers l'endomètre, les trompes de Fallope, l'ovaire, le péritoine (45).

On retrouve dans le vagin chez près de 60% de femmes saines la fréquente colonisation de *Ureaplasma urealyticum* et 20% de *Mycoplasma hominis*.

Mycoplasma hominis, isolé pour la première fois à partir d'un pus de bartholinite, est l'espèce la plus souvent concernée.

VI-2.1 Vaginites et cervicites

Chez la femme, le rôle pathogène des mycoplasmes est donc plus complexe. Les espèces impliquées sont davantage *M. hominis* et *M.genitalium*. Ce dernier serait le seul à jouer un rôle dans les cervicites (35).

Mycoplasma hominis est fréquemment isolé à partir de vaginites non spécifiques. Sa présence est-elle la cause ou la conséquence d'un tel syndrome. Il intervient

probablement en association avec d'autres agents (*Gardenerella vaginalis*, *Candida albicans*, trichomonas et diverses anaérobies).

L'épreuve thérapeutique ne permet pas de lui attribuer un rôle prépondérant. Il jouerait donc un rôle en symbiose avec les autres pathogènes, l'élévation du pH résultant de l'infection favorisant sa multiplication. (6)

VI-2.2 Endométrites, salpingites, inflammations pelviennes

Tout comme *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* peut provoquer une inflammation des organes pelviens(91). Il a de même été isolé maintes fois en culture pure au niveau de l'endomètre et des trompes de Fallope chez des femmes souffrant de salpingite diagnostiquée par laparoscopie. (29). Par ailleurs des études sérologiques(54,55) ont confirmé le rôle joué par *M hominis* dans les pelvipéritonites.

Egalement isolé au niveau des trompes de Fallope affectées, *Ureaplasma urealyticum* a cependant toujours été en association avec d'autres germes pathogènes.

VI-3 Mycoplasmes et troubles de la reproduction

VI-3.1 Stérilité

Le rôle joué par les mycoplasmes dans la stérilité masculine est controversé. La plupart des études constatent une diminution de la mobilité des spermatozoïdes dans les spermes infectés par *Ureaplasma urealyticum* (41,81). A cet effet Fowlkes et al. (41) ont noté que les échantillons séminaux desquels *U. urealyticum* avait été isolé, contenaient moins de spermatozoïdes et que ceux-ci

étaient moins mobiles et présentaient plus souvent des formes aberrantes, en comparaison d'échantillons à culture négative.

En outre, certains auteurs affirment que l'éradication d'*U. urealyticum* du tractus urogénital par un traitement antibiotique adéquat (doxycycline) entraîne une augmentation du taux de grossesse chez des couples dont l'étiologie de la stérilité était inexplicée. (14).

VI-3.2 Pathologies au cours de la grossesse

Les mycoplasmes, notamment *U. urealyticum* sont mis en cause dans des tableaux cliniques variés : chorioamniotites, avortements spontanés à répétition, prématurité.

Au cours de la grossesse *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* peuvent coloniser l'endomètre, les membranes fœtales, la liquide amniotique (16^{ième} ou 20^{ième} semaine de grossesse) (20) et les tissus fœtaux, comme ont pu le montrer des cultures de tissus prélevés par césarienne ou amniocentèse (22)

Cependant des études ont recherché une association entre une colonisation à *U. urealyticum* au niveau du col utérin et du placenta et le poids à la naissance ou la prématurité. Ces études ont fourni des résultats contradictoires(38,40) dont on ne peut tirer des conclusions définitives quant au rôle joué par ces micro-organismes.

Par ailleurs *M. hominis* joue un rôle certain dans les fièvres du post-partum. De nombreux articles mentionnent la présence de ce micro-organisme dans le sang de 5 à 10% de femmes qui développent une fièvre après l'accouchement(57,74). Des observations similaires ont été rapportées avec *U. urealyticum*(39).

VI-4 Atteintes néonatales

La colonisation par les mycoplasmes génitaux ; *M.hominis* et *U. urealyticum* est retrouvée chez 20 à 40% des nouveaux nés et est plus fréquente chez le prématuré. (2) Ils peuvent être transmis de la mère au fœtus in utero par voie ascendante ou hématogène, ou au nouveau-né lors du passage à travers les voies génitales colonisées (46).

- Bactériémies

Des observations ponctuelles sont en faveur de la responsabilité d'*U. urealyticum* dans d'authentiques infections pulmonaires avec bactériémies mais elles sont rares (1). *M.hominis* exceptionnellement a été rendu responsable de localisations infectieuses variées : péricardite sérofibrineuse avec tamponnade, adénite sous-maxillaire, abcès sous-cutané du scalp...(21)

- Infections respiratoires

Infecté par inhalation du liquide amniotique ou lors du passage dans les voies génitales maternelles, le poumon est l'organe le plus souvent atteint par les mycoplasmes génitaux chez le nouveau-né. Cependant, pour incriminer leur responsabilité, il faut tenir compte du lieu de prélèvement, les prélèvements endotrachéaux par aspiration étant plus spécifiques de l'infection pulmonaire sous-jacente et sans corrélation avec les prélèvements nasopharyngés.

- Pneumopathies aiguës

La place d'*U. urealyticum* parmi les différents agents étiologiques des détresses respiratoires néonatales infectieuses apparaît modeste même si ce micro-organisme est fréquemment isolé. D'autres part les souches d'*U. urealyticum* isolées des poumons de nouveau-nés humains infectés reproduisent une pneumopathie chez le souriceau.

Il a même été décrit des aspects évocateurs, y compris histologiques, de maladie des membranes hyalines, *U. urealyticum* pouvant altérer le surfactant par ses activités enzymatiques et la consommation de stérols. Des tableaux de persistance de la circulation fœtale ont également été rapportés, similaires à ceux observés avec le streptocoque B, en rapport vraisemblablement avec la formation de thromboxane. Ces infections sont essentiellement observées chez le prématuré.

- Dysplasie broncho-pulmonaire

Une vingtaine d'études cliniques depuis 1988 ont rapporté l'association entre la colonisation du tractus respiratoire par *U. urealyticum* dans les 24 à 72 heures suivant la naissance et l'apparition d'une dysplasie broncho-pulmonaire chez les nouveau-nés de très faible poids (20,95). La présence d'*U. urealyticum* est associée à une augmentation des concentrations d'interleukine 1 et de TNF-alpha (*tumor necrosis factor alpha*), les nouveau-nés chez lesquels apparaît une dysplasie broncho-pulmonaire ayant les taux les plus élevés (73).

Toutefois, la réalité de cette association a été récemment remise en cause. Plusieurs études utilisant des analyses multi variées et prenant en compte non seulement le poids de naissance mais aussi l'âge gestationnel ne la retrouvent pas (94). De même, la liaison statistique présente à 28 jours de vie n'est pas toujours retrouvée au terme corrigé de 36 semaines d'aménorrhée (28,76).

La signification clinique de la présence d'*U. urealyticum* dans les voies respiratoires, y compris dans le tissu pulmonaire, reste donc à préciser (19, 28,51). Il n'est pas possible, à l'heure actuelle, d'établir avec certitude un lien direct de causalité entre la colonisation par *U. urealyticum* et l'évolution vers un état complexe tel que la dysplasie broncho-pulmonaire.

Cependant, les infections respiratoires provoquées par *U. urealyticum* chez le très grand prématuré contribuent probablement à aggraver la pathologie initiale et participent, avec les facteurs spécifiques de l'hôte et de l'environnement, à la pathogénie de l'insuffisance respiratoire chronique (103). On ne peut exclure d'ailleurs qu'un facteur individuel ou environnemental prédispose à la fois à la colonisation par *U. urealyticum* et à la dysplasie broncho-pulmonaire (78).

- Infections du SNC

L'implication de *M. hominis* dans la méningite du nouveau-né est connue depuis 1970 (21, 91, 99,100). Ce dernier possède la faculté de croître après 48h d'incubation sur les milieux usuels utilisés en bactériologie contrairement à *U. urealyticum*. Cela explique que le premier isolement d'*U. urealyticum* dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) d'un prématuré présentant le tableau clinique d'une méningite, n'a été rapporté qu'en 1986 (44). Depuis lors on a décrit 22 cas d'infections du SNC par *U. urealyticum*, principalement chez des prématurés. Toutefois des études prospectives sur le sujet sont controversées, du fait du manque d'uniformité de la population étudiée. Pour des prématurés provenant d'une population gynécologique à haut risque et présentant un faible poids à la naissance (soit inférieur à 1.5 kg), Waites et al. ont noté une prévalence d'*U. urealyticum* dans l'infection du SNC de l'ordre de 8% (99). La même étude effectuée par le même groupe de chercheurs sur une autre population appartenant à un rang socio-économique plus élevé et fréquentant un hôpital privé, signale une fréquence d'isolement de l'ordre de 1.5% (100). Si on s'intéresse à des enfants plus âgés ou non hospitalisés, la fréquence d'isolement d'*U. urealyticum* au niveau du LCR devient nulle.

VI-5 Mycoplasmes et SIDA : la notion de cofacteur(58)

Les travaux des équipes de Montagnier L. et de LO S.C. (60), outre leur intérêt, ont permis de réactualiser l'importance des cofacteurs et des écosystèmes dans le processus physiopathologique pouvant conduire à la maladie surtout lorsque celle-ci est de nature aussi complexe que le SIDA.

Suite à quelques observations préliminaires, la mise en évidence d'une augmentation de cytolysse induite *in vitro* par le VIH en présence de mycoplasmes, les constatations faites *in vivo* et certaines homologies peptidiques entre mycoplasmes, CD₄ et protéines de classe II et même d'autres agents infectieux (CMV, HSV) suspectés d'être également des cofacteurs (50) conduisent maintenant à considérer deux hypothèses (25,60,68) :

- Le mycoplasme pourrait faciliter la pénétration du VIH dans la cellule sensible. Pour cela, le mécanisme le plus probable serait une déstabilisation de la membrane cellulaire par le mycoplasme dépourvu de paroi et avide de cholestérol.

Le mycoplasme aurait aussi un rôle plus complexe pouvant conduire à l'activation du provirus intégré dans les génomes de la cellule, à la stimulation du lymphocyte, à une immunosuppression par anticorps interposés avec blocage des relations CD₄ et protéines de classe II ou encore émission d'un signal provoquant l'apoptose et le suicide des lymphocytes.

VI-6 Mycoplasmes et Cancers

Jansen et coll. (53) ont récemment démontré plusieurs isollements de mycoplasmes à partir de la moelle osseuse chez des enfants leucémiques à des stades d'immunosuppression non encore instituée. Ce même auteur conclut que le rôle possible des mycoplasmes dans les leucémies reste à établir.

En outre, des résultats *in vitro* ont démontré le potentiel qu'ont certains mycoplasmes d'induire des changements caryotypiques et une transformation maligne lors de l'infestation chronique de cultures de tissus (18). Il faut néanmoins rester très prudent sur le rôle pathogène des mycoplasmes dans ces affections.

Bien qu'un rôle des mycoplasmes dans le développement de cancers d'une façon ou d'une autre ne soit que conjecture, un besoin demeure quant à la poursuite d'enquêtes épidémiologiques et expérimentales approfondies. (18)

VII – SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES : GENERALITES

VII-1 Antibiotiques : définition

Au sens strict du terme, les antibiotiques sont des agents antibactériens d'origine biologique et de ce fait naturels ; inhibant la croissance d'autres micro-organismes. Ils sont élaborés par des micro-organismes (champignons et diverses bactéries).

Cependant, avec le développement des méthodes de synthèse et d'hémi-synthèse, cette définition trop réduite s'est vue modifiée. On appelle alors antibiotique; toute substance qui, à faible concentration, inhibe la croissance bactérienne.

Un antibiotique est donc une substance naturelle (ex : Pénicilline G), semi-synthétique (ex : Ampicilline) ou synthétique (ex : chloramphénicol) douée d'une activité antibactérienne à l'échelon moléculaire s'exerçant au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques ou d'un équilibre physico-chimique.

Les réactions inhibées par les antibiotiques sont surtout des réactions de synthèse qui peuvent être protéiques, du peptidoglycane, des acides nucléiques ou encore des folates.

Pour être efficace, l'antibiotique doit satisfaire les trois conditions suivantes :

- pénétration à l'intérieur de la bactérie ;
- intervention au niveau d'une cible à l'intérieur de cette bactérie ;
- ne doit être ni inactivé, ni modifié, ni détruit par des enzymes pouvant être synthétisées par cette bactérie.

L'action de l'antibiotique se traduit alors soit par des modifications de la croissance (antibiotique bactériostatique), soit par des modifications de la capacité de survie (antibiotique bactéricide).

VII-2 Les différentes méthodes d'étude de la sensibilité

Effectuer un test de sensibilité d'une bactérie suppose de disposer d'une souche pure, par conséquent d'un isolement et d'une identification du germe incriminé, généralement à partir du produit pathologique.

VII-2.1) Macrométhodes d'étude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques (4)

La détermination des effets bactériostatique et bactéricide d'un antibiotique repose sur des faits expérimentaux.

Lorsque l'on met en contact des bactéries avec un antibiotique et que l'on suit la survie bactérienne en fonction du temps, on observe des phénomènes qui diffèrent selon la concentration en antibiotique :

Pour les plus basses concentrations (soit 0,5 à 2 μ g/ml), on observe un ralentissement de la croissance bactérienne, mais à tout moment le nombre de bactéries est supérieur ou égal au nombre initial des bactéries : l'antibiotique exerce alors un effet bactériostatique. Cet effet résulte soit:

- d'un ralentissement du temps de division bactérienne,
- d'un équilibre entre la croissance normale et la destruction des bactéries

Pour des concentrations plus élevées (soit 4,8 à 16 μ g/ml), on constate une réduction du nombre de micro-organismes au cours du temps : l'antibiotique exerce un effet bactéricide.

Parfois l'action antimicrobienne se révèle partielle, et après une détermination précoce du nombre de bactéries, on observe une reprise de la croissance bactérienne.

Ce phénomène dit de "**rebond**" peut être dû à :

- une instabilité de l'antibiotique *in vitro* ;
- une hétérogénéité de la population bactérienne qui peut comporter un nombre de bactéries génotypiquement plus résistantes que l'ensemble de la population

- une induction d'enzymes conférant une résistance aux bactéries vis-à-vis de l'antibiotique (bêta-lactamases)

L'action d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut ainsi être caractérisée par sa concentration minimale inhibitrice (CMI).

1) La notion de CMI d'un antibiotique (4,66)

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu de la souche étudiée (bactériostase). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories « **sensible** », « **résistante** » ou « **intermédiaire** » à l'action d'un agent antibactérien.

Une souche est dite « **résistante** » à un antibiotique donné, lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vivo* à des doses thérapeutiques et non toxiques.

A l'opposé, une souche est dite « **sensible** » à un antibiotique lorsque sa CMI est nettement inférieure à la concentration sanguine après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.

Si la CMI se situe entre ces deux extrêmes, la sensibilité de la souche bactérienne est dite « **intermédiaire** » : les micro-organismes ne pourront pas être atteints avec un antibiotique « **standard** ».

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution, par diffusion ou par élution.

Quelle que soit la méthode utilisée, elle doit être effectuée dans des conditions standardisées :

- milieu de culture adéquat choisi en fonction du germe à tester

Exemple : milieu de Mueller-Hinton(MH) supplémenté en ions (Ca^{2+} et Mg^{2+})

- inoculum bactérien adéquat.

1.1) Méthode par dilution en milieu liquide (42)

Une série de tubes estensemencée avec 10^5 UFC /ml de la bactérie à étudier en bouillon Mueller-Hinton(MH). Ensuite, des quantités croissantes d'antibiotiques sont ajoutées de façon à réaliser une gamme de concentration en progression de raison 2. Un tube sans antibiotique servira de témoin.

Après 18h à 37°C , la CMI correspond à la concentration d'antibiotique présente dans le tube où il n'y a pas de culture visible.

Méthode pouvant aussi être réalisée en microplaques, ce qui permet d'automatiser la technique.

CMI

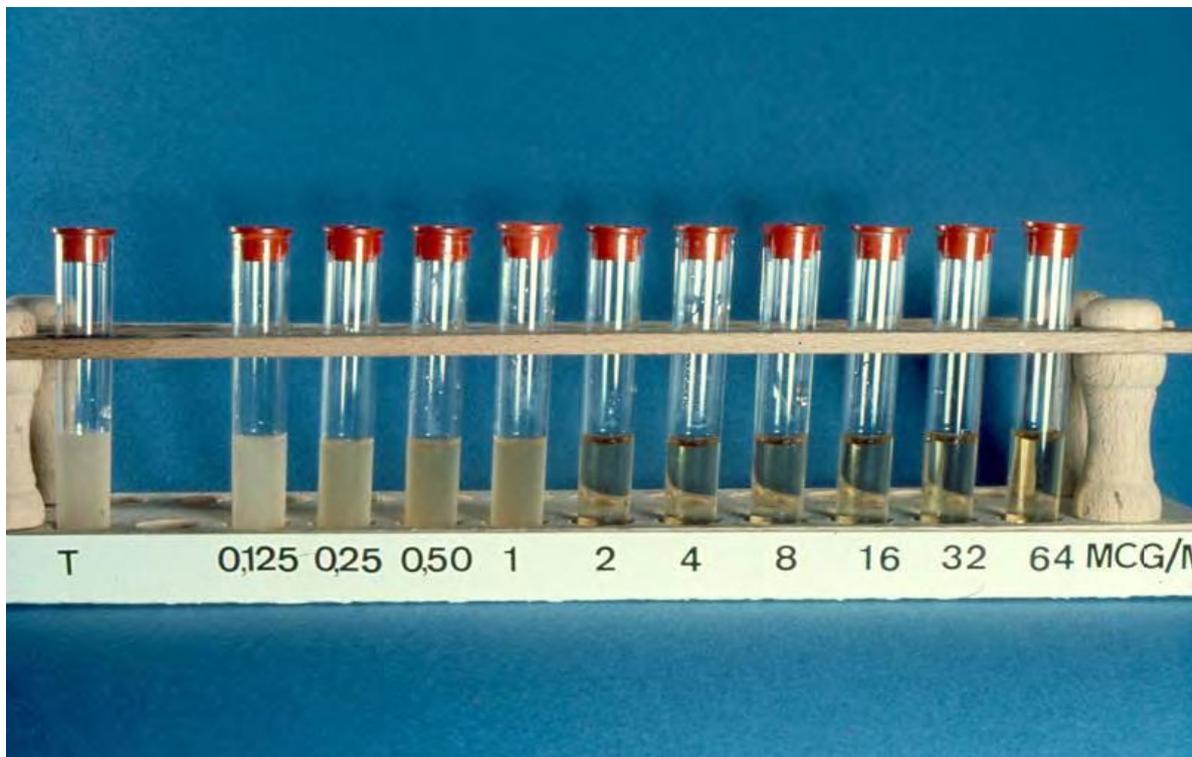


Figure.1 Détermination de la CMI en milieu liquide

1.2) Méthode par dilution en milieu solide

Cette méthode est celle recommandée par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Le principe est le même à la différence que ici l'antibiotique est incorporé dans la gélose MH. Chaque boîte de pétri correspond à une concentration donnée d'antibiotique. Il est possible de tester sur la série de boîte contenant la gamme des concentrations d'antibiotique plusieurs souches déposées sous forme de spots (à l'aide d'un enseigneur multipointes) ou en stries avec un inoculum de 10^4 UFC/spot

La CMI correspond alors à la concentration d'antibiotique présente dans la première boîte où il n'y a pas de croissance de la bactérie.

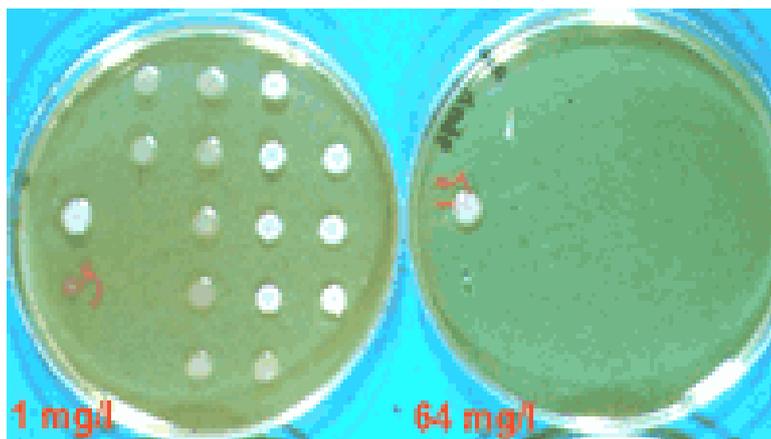


Figure.2: Détermination de la CMI en milieu solide par dilution en gélose

1.3) Méthode par diffusion en milieu solide : E-Test (epsilometer test)

Une approche est d'utiliser des bandelettes de plastique imprégnées d'un gradient prédéfini de concentration croissantes d'antibiotique. C'est la technique des E-test.

Le milieu gélosé recommandé selon la bactérie à étudier est ensemencé par écouvillonnage avec la souche à 0.5 McFarland, soit environ 10^8 UFC/ml.

La bandelette qui est un support inerte, hydrophobe de 5mm de large et 50mm de long est appliquée sur la surface de la gélose ainsi ensemencée. Le gradient préformé exponentiel d'antibiotique est immédiatement transféré sur la gélose une fois la bandelette déposée (quelques secondes). Après incubation 18 à 24H à 37°C, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme.

La CMI correspond à la concentration d'antibiotique lisible au point où l'ellipse croise la bandelette.

Technique facile à réaliser en routine, elle permet d'obtenir des CMI avec une bonne concordance avec les CMI réalisées par dilution en milieu gélosé, pour la plupart des espèces bactériennes.

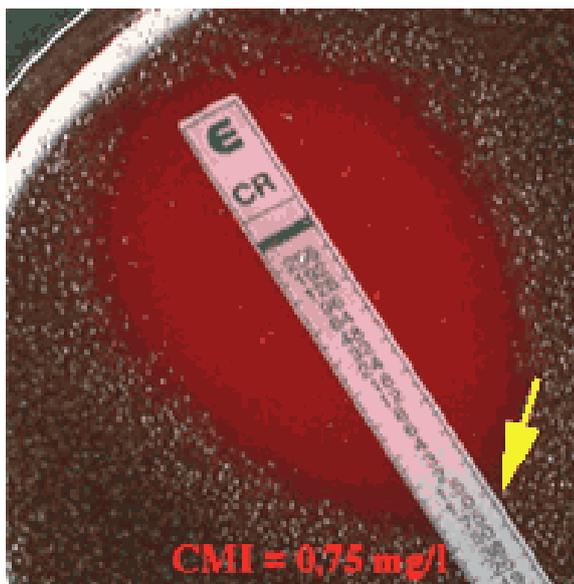


Figure3 : Détermination de la CMI en milieu solide par diffusion en gélose

Technique E-test

La détermination des CMI, encore assez fastidieuse à réaliser, ne peut être envisagée en routine (la technique du E-test bénéficie cependant des avantages de rapidité d'exécution, simplicité, large choix des molécules à tester) pour toutes les bactéries isolées et tous les antibiotiques testés et, reste réservée à quelques cas particuliers (pneumocoque de sensibilité diminuée aux pénicillines, staphylocoques et entérocoques résistants aux glycopeptides, germes à croissance lente, infections sévères...).

En routine, l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est effectuée grâce à la technique de l'antibiogramme.

2) Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

Cette méthode repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans le milieu gélosé à partir d'un support papier imprégné.

Des disques de papier pré imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'une géloseensemencée avec la bactérie à étudier. L'antibiotique diffuse à

partir du disque de papier selon un gradient de concentration. Après 18 à 24h d'incubation à 37°C, une zone d'inhibition centrée sur le disque se forme ; la concentration d'antibiotique en bordure de la dite zone correspond à la CMI de l'antibiotique pour la souche étudiée.

Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètre et des courbes de concordance diamètre- CMI sont réalisées (figure4). Ces courbes sont construites pour chaque antibiotique à partir d'échantillons représentatifs des différentes espèces bactériennes ; elles ne sont valables que si les paramètres sont rigoureusement contrôlés.

La gélose utilisée est celle de MH pour la plupart des germes et son épaisseur doit être de 4mm. La composition du milieu gélosé est importante car des modifications de composition peuvent avoir une incidence sur le résultat des tests de sensibilité par certains antibiotiques. Pour les bactéries exigeantes, des additifs peuvent être ajoutés comme du sang à 5% (*streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter*, *Neisseria meningitidis*). Pour les bactéries anaérobies, on utilisera plutôt une gélose Wilkins-Chalgren additionnée de 5% de sang ; pour *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus* on utilisera une gélose chocolat polyvitex.

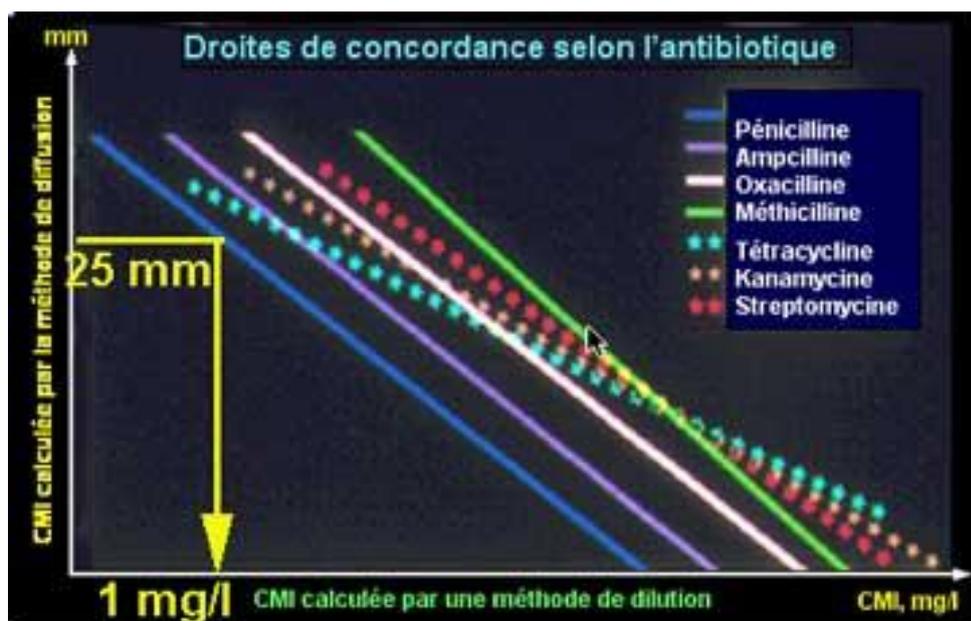


Figure4 : Courbes de concordance diamètre d'inhibition-CMI

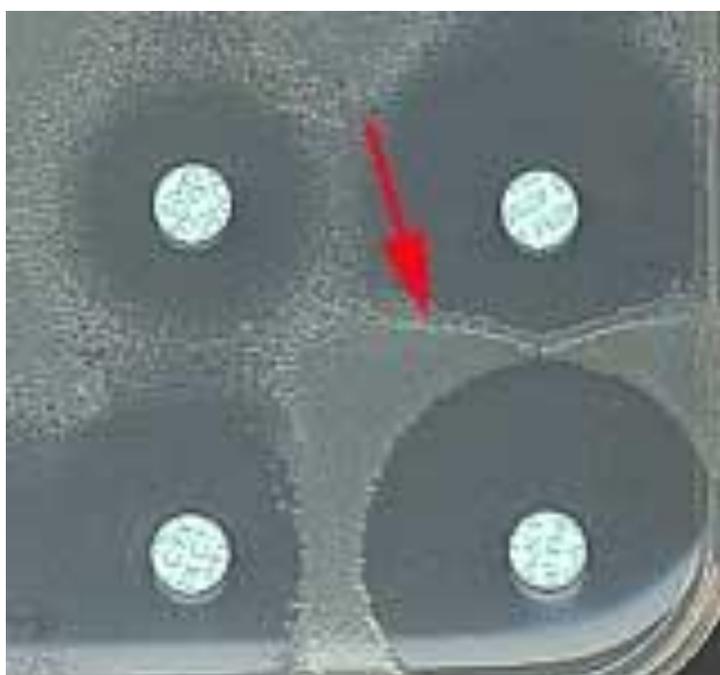


Figure5 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton

VII-2.2) Microméthodes d'étude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques

1) Méthodes utilisant deux concentrations critiques

Les concentrations en antibiotique qu'il est possible d'obtenir dans l'organisme se définissent par une zone de taux thérapeutiques délimitée par deux valeurs critiques exprimées en $\mu\text{g/ml}$.

La concentration critique inférieure (CCI) correspondant au taux sanguin moyen obtenu aux posologies habituelles.

La concentration critique supérieure (CCS) correspondant au taux sanguin maximal obtenu par l'administration de fortes doses.

Avec cette méthode, on peut interpréter directement les résultats de l'antibiogramme.

En effet, on utilise les concentrations critiques supérieures et inférieures fixées par les comités nationaux d'antibiogramme.

Le résultat obtenu est logique après lecture à l'œil nu :

La croissance en présence de la plus forte concentration d'antibiotique est le fait de souches résistantes ;

La croissance en présence de la plus faible concentration est caractéristique des souches intermédiaires.

L'inhibition de la croissance aux deux concentrations d'antibiotique est spécifique des souches sensibles.

2) Méthodes utilisant une concentration critique

Ces méthodes étudient la croissance de la bactérie en présence d'une seule concentration d'antibiotique adaptée pour discriminer les bactéries sensibles des résistantes. Cette concentration n'est pas liée aux concentrations critiques.

3) Systèmes effectuant une analyse cinétique de la croissance

L'analyse cinétique de la croissance bactérienne a été la base du premier système d'antibiogramme automatisé et commercialisé. Le principe de fonctionnement ne diffère cependant pas fondamentalement des systèmes utilisant une concentration. Les systèmes donnent des réponses précoces et permettent quelques fois l'estimation de la CMI :

- soit en utilisant plusieurs concentrations d'antibiotiques.
- soit en utilisant un calcul spécifique (propre à chaque fabricant).

VII-2.3) Facteurs influençant l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

1) Facteurs extrinsèques (66)

L'étude de l'action des antibiotiques n'obéit pas à une loi physique simple aisément formulable par une équation mathématique. Les phénomènes biologiques complexes qui entrent en jeu dépendent de nombreux paramètres, pas toujours indépendants. Il est donc important de standardiser les techniques pour une bonne appréciation de l'activité antibiotique. L'observation rigoureuse des règles régissant l'encadrement des différents facteurs s'avère primordiale pour avoir des résultats fiables.

1.1) L'environnement des cultures

☞ Température d'incubation

L'élévation de la température entre 37°C et 42°C entraîne une augmentation progressive de l'activité antibiotique.

☞ Atmosphère d'incubation

- Aéro-anaérobiose

Certains antibiotiques sont peu influencés (Ex : Chloramphénicol)

- Le pH

Le pH influence l'activité de presque tous les antibiotiques.

Les antibiotiques très actifs en milieu acide sont les pénicillines, céphalosporines et tétracyclines.

Les antibiotiques très actifs en milieu alcalin sont les macrolides, les oligosaccharides.

En pratique, dans les tests de routine d'étude de la sensibilité des souches, on travaille en général à un pH proche du pH physiologique.

☞ Composition du milieu

- Glucides

Les glucides peuvent influencer l'action d'un antibiotique en augmentant la croissance bactérienne et/ou en modifiant le pH

- Ions

Selon le cas, ils activent ou amplifient l'action de l'antibiotique et/ou la croissance bactérienne. Exemple : Ca^{2+} ; Mg^{2+}

1.2) L'antibiotique

Les solutions d'antibiotique doivent être préparées et conservées selon des règles bien établies.

Ainsi, les préparations standards ou de références obtenues directement sont dissoutes dans un solvant approprié et diluées de façon à obtenir les concentrations désirées. Les solvants et diluants utilisés ne doivent pas inhiber l'action de l'antibiotique. Les antibiotiques doivent être conservés selon les directives du fabricant en ce qui concerne les poudres ; pour ce qui est des solutions, elles sont généralement conservées à -20°C ou à -70°C .

1.3) L'inoculum bactérien

Plusieurs facteurs tiennent compte de l'inoculum :

- Le nombre de bactériesensemencées
- La phase de croissance de la cultureensemencée
- La vitesse de croissance de la bactérie

☞ Nombre de bactériesensemencées

L'importance de ce facteur varie selon l'antibiotique et selon l'hétérogénéité éventuelle de la population bactérienne : si la population est homogène, les variations de la CMI sont assez faibles pour la plupart des antibiotiques. Entre 10^4 et 10^6 bactéries / ml par exemple, la CMI varie du simple au double pour les pénicillines, les macrolides. C'est pourquoi on utilise en général un inoculum de 10^5 à 10^6 bactéries / ml.

Un inoculum faible (10^3 bactéries / ml) augmente la sensibilité alors qu'un fort ($>10^6$ bactéries) la diminue fortement.

☞ Phase de croissance de l'inoculum

La phase de croissance dans laquelle se trouve la culture de laquelle est prélevé l'inoculum intervient dans l'activité de l'antibiotique. L'action de l'antibiotique en effet est liée à un certain état du métabolisme bactérien.
Exemple: la Pénicilline utilise un inoculum en phase de croissance.

1.4) Le temps d'incubation

Le temps au bout duquel s'effectue la lecture de même que les procédés d'appréciation (optique ou photométrique) jouent un rôle important dans les tests de sensibilité.

2) Facteurs intrinsèques

Ce sont tous les facteurs liés à la bactérie elle-même.

2.1) Notion de résistance (4, 66,77)

La résistance aux antibiotiques est un caractère de la bactérie qui en tant que tel s'exprime par la synthèse de protéines.

La prescription d'un antibiotique, qu'elle soit empirique ou consécutive à des résultats bactériologiques, doit tenir compte des notions de sensibilité et de résistance des bactéries suspectées ou effectivement impliquées.

Une souche est dite « **résistante** » lorsque les concentrations sériques sont inférieures à la CMI de l'antibiotique.

Une souche est dite « **résistante** » lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

2.2) Les différents types de résistance et leurs mécanismes

La résistance d'un micro-organisme vis-à-vis d'un antibiotique répond à deux types possibles : il peut s'agir d'une résistance naturelle ou alors acquise.

☞ Résistance naturelle

Il s'agit d'une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement au sein de toutes les souches d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait donc partie du patrimoine génétique normal du germe.

Exemple : Les mycoplasmes présentent une résistance naturelle aux molécules actives contre la paroi (bêta-lactamines, fosfomycines, glycopeptides)

☞ Résistance acquise

C'est l'acquisition de nouveaux gènes survenant au sein de quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible et capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques.

Ce nouveau gène peut résulter soit d'une mutation au niveau du chromosome (ce qui est un phénomène rare), soit d'un transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent).

Exemple : les *staphylocoques aureus* développent une résistance à la méticilline (Méti R)

☞ Mécanismes de résistance

Trois mécanismes principaux sont responsables de la résistance aux antibiotiques. Ils résultent simplement d'une réaction logique du germe face au mode d'action d'une molécule qui l'attaque ; la bactérie peut ainsi se rendre imperméable à l'antibiotique ou s'opposer à son transport ; peut synthétiser des enzymes qui le modifient ou l'hydrolysent ; peut protéger la cible.

- Imperméabilisation de la paroi

Pour les bactéries Gram négatif, elle concerne la membrane extérieure ; la membrane cytoplasmique pour les autres. C'est le mécanisme le plus souvent responsable de la résistance naturelle ; les antibiotiques concernés peuvent être les bêta-lactamines, cyclines, phénicolés, macrolides.

Mais on peut également rencontrer ce mécanisme dans la résistance mutationnelle, pouvant alors concerner quinolones, aminosides, phénicolés, beta-lactamines et même dans la résistance plasmidique ; avec les tétracyclines.

- Inactivation (par synthèse enzymatique)

Correspond au mécanisme le plus souvent responsable de la résistance plasmidique. Les antibiotiques particulièrement concernés sont

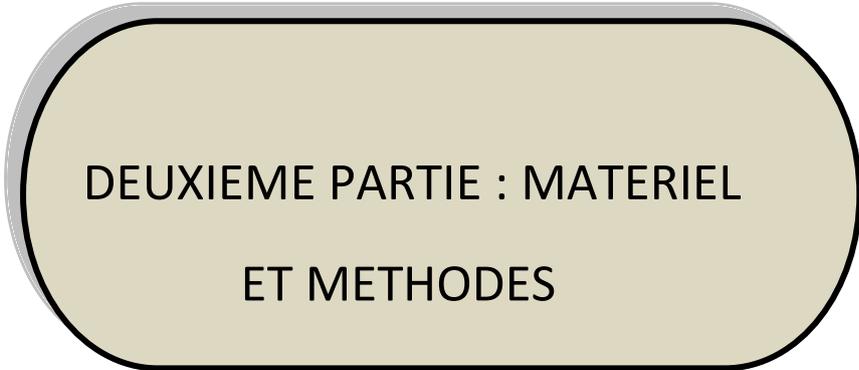
- Les bêta-lactamines ; par hydrolyse du cycle bêta-lactame
- Les aminosides ; transférases qui phosphorylent, acétylent ou adénylent des sites de la molécule
- Les phénicolés ; transférases qui acétylent la molécule

- Modification de la cible

La cible est légèrement modifiée par la substitution d'un acide aminé dans la protéine (enzyme ou protéine ribosomale) ou la substitution d'un nucléotide (ARN ribosomal). Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise (paroi, ribosome) ; toute modification généralement consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique. C'est le mécanisme généralement responsable de la résistance mutationnelle ; bêta-lactamines, aminosides, quinolones, macrolides peuvent être concernés.

Mais on peut également rencontrer ce mécanisme dans la résistance plasmidique ; ici dans le cas des macrolides, une méthylase modifie deux nucléotides du ribosome lequel perd son affinité pour l'antibiotique.

Pour ce qui est des sulfamides ou de la triméthoprine, le plasmide code pour des iso enzymes qui ne fixent pas ces molécules.



DEUXIEME PARTIE : MATERIEL
ET METHODES

I- MATERIEL

I.1- Matériel pour la préparation des milieux

- ☞ balance de précision
- ☞ agitateur magnétique
- ☞ pH-mètre
- ☞ flacons en verre avec bouchon à vis de 5, 100, 150 ml
- ☞ seringues
- ☞ filtres de 0,2 μm de diamètre
- ☞ tube stériles à bouchons de 2,5 et 5ml
- ☞ erlenmeyer
- ☞ embouts stériles
- ☞ micro pipettes
- ☞ autoclave
- ☞ boîte de pétri de 4 ou 6cm de diamètre
- ☞ hotte à flux laminaire
- ☞ papier emballage
- ☞ appareil de scellage

I.2- Matériel pour l'isolement et l'identification

- ☞ micro plaques
- ☞ micro pipettes de 20 μl , 200 μl
- ☞ pipette Pasteur
- ☞ embouts stériles
- ☞ étuve

- ☞ films adhésifs
- ☞ bec bunsen
- ☞ jarre d'incubation
- ☞ microscope optique
- ☞ générateur de CO₂ ou bougie

I.3- Matériel pour la conservation des souches

- ☞ Cryotubes à billes
- ☞ Tubes à visse
- ☞ Tubes nunc
- ☞ Ecouvillons
- ☞ Portoir

I.4- Matériel pour la préparation des antibiotiques

- ☞ micro plaques
- ☞ micro pipettes de 10 µl, 1000 µl
- ☞ embouts
- ☞ four à micro-onde
- ☞ hotte à flux laminaire
- ☞ tubes à essai pour les dilutions
- ☞ eau distillée stérile
- ☞ filtres
- ☞ seringues

I.5- Réactifs

☞ bouillon A 3 : milieu de conservation et de transport des mycoplasmes.

☞ bouillon arginine : milieu de d'isolement et d'identification de *Mycoplasma hominis*

☞ bouillon urée : milieu d'isolement et d'identification de *Ureaplasma urealyticum*

☞ gélose Mycoplasma A7

☞ bouillon glucosé

☞ kit commercialisé pour contrôle de qualité

☞ antibiotiques testés : ils appartiennent à différentes familles

- Les cyclines :

Tétracycline

Doxycycline

- Les macrolides :

Erythromycine

Lincomycine

- Les quinolones :

Ofloxacin

Péfloxacin

Ciprofloxacine

II- METHODES

II.1- Identification

Les souches soumises à notre étude bien que connues seront ré-identifiées et titrées conformément au seuil standard de pathogénicité. Au cours de cette identification, on procèdera parallèlement à la culture sur gélose A7.

Principe

☞ En milieu liquide

Mycoplasma hominis et *Ureaplasma urealyticum* sont respectivement incubés dans les bouillons arginine, urée et glucose en présence d'un indicateur coloré ; le rouge de phénol. Le principe est alors basé sur le métabolisme du substrat présent dans le bouillon (urée, arginine ou glucose) ; lequel est détecté par le virage de l'indicateur de pH.



L'ammoniac libéré augmente le pH dans le milieu entraînant ainsi le virage de l'indicateur qui devient alors rouge-orangé et rose framboise pour l'urée et l'arginine respectivement.

Les acides libérés par la fermentation du glucose vont diminuer le pH entraînant le virage du milieu au jaune.

Chaque espèce est identifiée par sa capacité à métaboliser ou non le substrat.

Notons que la croissance des mycoplasmes ne s'accompagne pas du trouble du milieu qui traduirait une autre croissance bactérienne. A cet effet, les levures sont capables de métaboliser certains constituants du milieu en libérant des substances basiques. Leur croissance s'accompagne du trouble et /ou d'un dépôt blanchâtre.

☞ En milieu solide

L'identification est macroscopique, reposant sur l'aspect caractéristique des colonies de chaque espèce.

Les colonies de *Ureaplasma urealyticum* sont irrégulières, très petites, 15 à 50 μ d'où leur ancien nom de souche T (tiny : minuscule), brunes en présence de sulfate de manganèse. Elles apparaissent en 2 à 4 jours et se présentent sous la forme d'oursin ; à ne pas confondre avec des cristallisations dans la gélose.

Mycoplasma hominis donne en 2 à 4 jours des colonies dites larges d'environ 10 à 600 μ en forme d'œuf sur le plat.

Tableau I : Caractères d'identification des mycoplasmes urogénitaux le plus souvent isolés (10)

	Hydrolyse de l'arginine	Hydrolyse de l'urée	Fermentation du glucose	Aspect des colonies sur gélose
<i>Mycoplasma hominis</i>	+	-	-	Œuf sur le plat
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	+	-	Oursin
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	-	+	

Mode opératoire

☞ En milieu liquide

La microplaque utilisée dispose de 16 puits. Chaque échantillon souche est inoculé dans quatre puits dont deux chacun pour les bouillons urée et arginine.

Les bouillons sont distribués à l'aide d'une micropipette à raison de **180µl** par cupule. Après homogénéisation du contenu du milieu de transport, **20µl** sont inoculés dans chaque première cupule de microtitration et ce pour chaque type de bouillon. Bien mélanger par aspirations et refoulements. A l'aide d'un autre ambout, **20µl** de chaque premier puits est introduit dans le second puits.

Il est indispensable de changer d'ambout du fait de l'adhérence des mycoplasmes au plastique.

Les microplaques sont ensuite recouvertes d'un film adhésif et incubées à 37°C sur un support humide (papier buvard imbibé d'eau) afin d'éviter la déshydratation du contenu des puits.

La lecture est effectuée au bout de 24h ; en cas de réaction négative une réincubation est effectuée pendant 24h supplémentaires pour une deuxième lecture.

☞ En milieu solide

Après agitation du milieu de transport A3, un aliquote est prélevé à la pipette Pasteur et déposé dans la gélose A7. La gélose préalablement séché 15 minutes à 37°C est ainsiensemencé par 3 gouttes de bouillon (les gouttes étant non confluentes) sans étalement.

La gélose ainsiensemencée est séchée 5 minutes à l'air ambiant.

La lecture est effectuée au microscope optique à l'objectif X10 après 2 à 4 jours d'incubation en atmosphère anaérobie (jarre) ou microaérophile.

II.2- Recherche de l'inoculum I₀ de travail

Tel que précédemment évoqué, les souches soumises à notre étude sont ré-identifiées et titrées à l'aide de dilutions croissantes ; le titre correspondant à la première dilution ayant donné une réaction négative, servira d'inoculum de départ pour notre étude. Soit I₀ cet inoculum.

Principe

Il est basé sur les dilutions successives opérées dans le milieu de transport puis dans le milieu d'identification.

Mode opératoire

J1

Chaque aliquote prélevé à partir de la souche de départ (contenue dans le milieu de transport) est ensemencé jusqu'à une dilution de 10^{-2} tel que décrit précédemment. Le milieu de transport est ensuite conservé à $+4^{\circ}\text{C}$.

J2

Pour les cupules positives et convenablement identifiées, les milieux de transport respectifs seront ensemencés à des dilutions allant de 10^{-3} à 10^{-9} afin de déterminer la dilution finale qui correspond au dernier puits positif.

II-3 recherche du temps d'incubation adéquat et effet de l'inoculum sur

l'identification par la galerie micro-CSB Myco

Comme précédemment évoqué l'inoculum de départ pour notre travail (I_0) est constitué par la première dilution objectivant une réaction négative.

Principe

A partir de t_0 , nous prélevons **200 μl** de l'inoculum bactérien correspondant préparé extemporanément que nous incubons pendant différents temps.

Au bout de chaque période d'incubation l'échantillon est ensemencé sur microplaque CSB pour identification ; dans le but de mettre en évidence l'inoculum qui après un temps d'incubation **t** est capable de fournir la meilleure identification du germe.

Technique

L'inoculum correspondant à *U. urealyticum* sera alors incubé à 37°C pendant différents temps : $t_1=12\text{h}$ puis $t_2=16\text{h}$; $t_3=18\text{h}$ et $t_4=24\text{h}$. Au terme de chaque période, l'on distribue après homogénéisation des inocula, **20 μl** dans chaque

cupule de microtitration comme précédemment expliqué. Chaque microplaque est ensuite recouverte et incubé comme indiqué plus haut. La lecture est effectuée au bout de 24h.

Puis **100µl** soit environ 3 gouttes seront déposées dans la gélose A7, sans étalement. Incubation et lecture comme indiqué précédemment.

Une approche similaire se fera pour *M. hominis* à des temps d'incubation plus longs cependant ; soit $t_1=18h$, $t_2=24h$, $t_3=36h$ et $t_4=48h$.

II.4- Etude de la sensibilité

La croissance trop lente des mycoplasmes ne permet pas d'utiliser l'antibiogramme classique avec la technique des disques en milieux gélosés. Il faut donc procéder à une étude de l'activité antibiotique par la méthode des dilutions en milieu liquide qui permet de définir la CMI (concentration minimale inhibitrice) ou plus exactement la CMM (concentration minimale métabolique) ; Puisque la culture est jugée sur la variation du pH qu'entraîne l'hydrolyse de l'urée ou de l'arginine pour *U.urealyticum* et *M.hominis* respectivement.

Principe

L'étude de sensibilité aux antibiotiques va consister à ajouter au milieu

(mélange inoculum -substrat) deux concentrations critiques d'un antibiotique donné ; les concentrations critiques supérieure(C.C.S) et inférieure(C.C.I). Après une incubation de 18 à 24 heures voire 48h à 37°C, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

Mode opératoire

L'inoculation des plaques pour la réalisation de l'antibiogramme se fera à partir des différents inocula précédemment obtenus et incubés, respectivement pour *U. urealyticum* et *M. hominis* ; afin de respecter les besoins de notre étude.

On distribuera **100 µl** de chaque inoculum dans les cupules contenant les antibiotiques déshydratés et dans deux cupules servant de témoin de croissance, c'est-à-dire exempt d'antibiotiques.

Recouvrir enfin la plaque de papier adhésif et incuber à 37°C pendant 24 à 48 H sous papier buvard humide.

Effet de l'inoculum : technique

Dans l'optique d'obtenir une meilleure étude de sensibilité possible, nous allons faire varier l'inoculum au cours de la réalisation de l'antibiogramme pour chaque espèce respectivement.

Pour *U. urealyticum*, nous préparons un volume de **6000µl** soit **6ml** de l'inoculum I_0 que nous incubons à différents temps à 37°C.

A $t_1=12h$, nous prélevons **1600µl** qui serviront au test de sensibilité, à raison de **100µl** par cupule. Nous répétons ainsi l'opération à $t_2=16h$; $t_3=18h$ et $t_4=24h$. Un volume identique est préparé pour *M. hominis* et nous procédons aux mêmes étapes de réalisation du test pour des temps d'incubations différents ; soit $t_1=18h$, $t_2=24h$, $t_3=36h$ et $t_4=48h$.

Lecture et interprétation

L'interprétation de l'antibiogramme se fait dès que les cupules témoins de croissance ont viré du jaune au rouge.

En pratique on réalise une lecture à 24 h et une autre à 48 h. La lecture à 48h permettant de déceler les résistances de bas niveau.

-les 2 cupules contenant l'antibiotique sont jaunes : absence de croissance

➔ Souche sensible

- les 2 cupules contenant l'antibiotique sont rouges : croissance en présence de l'antibiotique

→ Souche résistante.

-absence de croissance dans la cupule C.C.S et croissance dans la cupule C.C.I : cupule jaune et rouge respectivement

→ Souche intermédiaire

- croissance dans la cupule C.C.S et absence de croissance dans la cupule C.C.I : cupule rouge et jaune respectivement

→ Problème technique

III- VALIDATION

La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'un test microbiologique donné procurera des résultats suffisamment fiables et reproductibles compte-tenu du but de l'analyse. Ainsi la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique ; et en préciser les limites de validité. Elle peut se décomposer en différents modules correspondant à l'évaluation de chacune de ses caractéristiques : linéarité du domaine d'utilisation, limite de détection, précision, répétabilité et reproductibilité, spécificité, sensibilité, exactitude.

Aussi nous étudierons quelques paramètres : reproductibilité et répétabilité, linéarité ; à différentes étapes de notre étude.

III.1- La reproductibilité

Elle consistera à effectuer les tests d'identification et de sensibilité Micro CSB Myco des mêmes souches pour chaque lot de milieux préparés.

Pour ce faire pour trois à quatre lots de milieu préparés pour l'identification et l'étude de la sensibilité sur plaque MicroCSB Myco, on effectue les tests respectifs à partir de l'inoculum adéquat, pour un échantillon pris dans chaque lot.

L'inoculum employé à cet effet est celui déterminé par notre expérimentation, comme ayant fourni la meilleure identification pour un temps d'incubation donné de même que celui ayant fourni la meilleure sensibilité ; et ce pour chaque test respectivement.

Les souches doivent présenter le même profil métabolique pour les trois lots pour que la méthode tenant compte de notre inoculum et du temps d'incubation adéquat soit considérée comme reproductible.

III.2- La répétabilité

Elle consistera à tester la microméthode d'identification et d'étude de sensibilité à partir de l'inoculum déterminé précédemment pour chacun des tests. Une même souche va être identifiée par des échantillons d'un même lot n fois, dans les mêmes conditions et ce pour chaque souche. On pourra par exemple prendre $n=3$.

La méthode tenant compte de notre inoculum et du temps d'incubation adéquat est considérée comme répétable lorsque le profil métabolique de la souche est identique autant de fois.

III.3- La linéarité du domaine d'analyse

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé.

☞ Corrélation et droite de régression

Notion de corrélation

La corrélation consiste à mesurer le degré d'association existant entre deux caractères. Pour calculer le coefficient de corrélation entre 2 variables, cela revient à résumer la liaison qui existe entre les variables à l'aide d'une droite. On parle alors d'un ajustement linéaire.

Pour calculer les caractéristiques de cette droite, il faut faire en sorte que l'erreur que l'on commette en représentant la liaison entre nos variables par une droite, soit la plus petite possible. Le critère formel le plus souvent utilisé, mais pas le seul possible, est de minimiser la somme de toutes les erreurs effectivement commises au carré. On parle alors d'ajustement selon la méthode des moindres carrés ordinaires. La droite résultant de cet ajustement s'appelle une droite de régression. Plus la qualité globale de représentation de la liaison entre nos variables par cette droite est bonne, et plus le coefficient de corrélation linéaire associé l'est également. Il existe pour ainsi dire une équivalence formelle entre les deux concepts.

Droite de régression

Dans les cas où le diagramme de dispersion montre l'existence d'une relation linéaire, on désire déterminer la droite qui décrira le mieux cette relation. Cependant, le choix de cette droite dépend d'un critère qu'il faudra fixer. Le critère mathématique est celui des moindres carrés. Selon ce critère, on cherche à minimiser la somme des carrés des écarts entre les valeurs estimées et les valeurs observées de la variable dépendante.

En formule la droite de régression est donnée par : $y = ax + b$

Avec :

x = la valeur de la variable indépendante

y = la valeur estimée de la variable indépendante

b = l'ordonnée à l'origine

a = la pente

IV- CONTROLE DE QUALITE

Il vise la vérification des différentes phases techniques du test. Différents paramètres vont ainsi être étudiés :

☞ La stérilité

-En milieux liquides

1ml de chaque milieu préparé est déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h. En l'absence de trouble et de virage de l'indicateur coloré, les milieux seront considérés comme stériles.

Ce même test est effectué simultanément en microplaques de titration pour plus de sécurité.

- En milieux solides

Une boîte gélosée de chaque lot préparé est placée à l'étuve à 37° C pendant 24 à 48h. Les milieux sont considérés comme stériles en l'absence de croissance de colonies ou de virage de l'indicateur.

☞ L'efficacité

Le milieu considéré comme stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif avec une souche de contrôle

positif pour chaque caractère donné et un résultat négatif avec une autre souche de contrôle négatif.

☞ La stabilité

A partir du moment où la méthode est considérée comme stérile, efficace, il s'agit de déterminer le temps au bout duquel les milieux resteraient efficaces en donnant de bons résultats avec les témoins positifs et négatifs. Il s'agit également de déterminer les conditions optimales de conservation.

- On étudiera la température de conservation à 4°C et à 20°C
- Le temps de conservation à 1mois, 2mois et 3mois.

Seuls les tests stériles dans le temps devront être utilisés.

☞ La spécificité

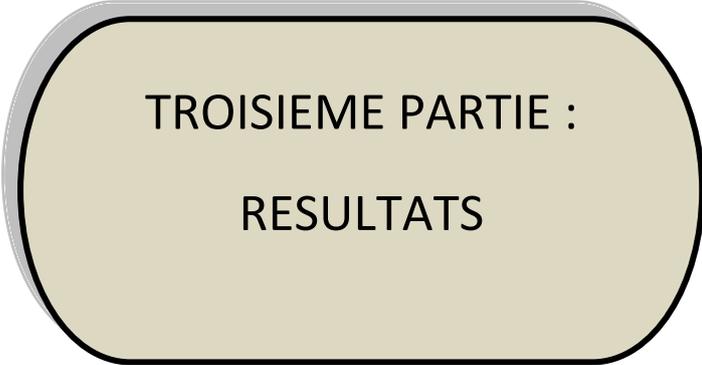
La spécificité de la méthode va être évaluée à l'aide de kits commercialisés. L'on réalisera simultanément les ensemencements afin de mener une étude comparative.

☞ La rapidité

Nous déterminerons le temps moyen de réalisation du test par le personnel manipulant d'une part et d'autre part la durée de la lecture finale de la culture.

☞ Le coût

Le coût va être évalué par la détermination de la valeur de tous les constituants du test.



TROISIEME PARTIE :
RESULTATS

I- LECTURE ET EXPRESSION DES RESULTATS

I.1 Identification de *Ureaplasma urealyticum*

Le principe reposait sur l'observation du changement de coloration initiale (jaune) du milieu urée, permettant ainsi de mettre en évidence la présence de germes viables de *Ureaplasma urealyticum* à différents temps d'incubation.

L'inoculum I_0 de départ a été déterminé à la suite de dilutions successives allant de 10^{-3} à 10^{-9} . I_0 était alors constitué de la première dilution objectivant une réaction négative, soit la dilution correspondant à 10^{-6} .

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau I : Effet de l'inoculum sur l'identification de *U. urealyticum* partir de prélèvements pathologiques

Temps d'incubation(h)	Densité (McF)	Coloration après 24h		Conclusion
		Cupule 1	Cupule 2	
t= 12h	0,6	Rouge orangé	Rouge orangé	Croissance
t= 16h	0,7	Rouge orangé	Rouge orangé	Croissance
t= 18h	0,8	Rouge orangé	Rouge orangé	Croissance
t= 24h	0,8	Rouge orangé	Jaune	

Tableau II : Effet de l'inoculum sur l'identification de *U. urealyticum* à partir de prélèvements pathologiques

Temps d'incubation(h)	Densité(McF)	Coloration après 24h		Conclusion
		Cupule 1	Cupule 2	
t= 12h	0,6	Jaune	Jaune	Croissance nulle
t= 16h	1,1	Rouge orangé	Rouge orangé	Croissance
t= 18h	1,3	Rouge orangé	Rouge orangé	Croissance
t= 24h	1,9	Jaune	Jaune	Croissance nulle

I.2- Identification de *Mycoplasma hominis*

L'inoculum était également constitué de la dilution correspondant à 10^{-6} .

Tableau III : Effet de l'inoculum sur l'identification de *M.hominis* à partir de souche isolée en milieu solide.

Temps d'incubation(h)	Densité (McF)	Coloration après 24h		Coloration 48h		Conclusion (après 48h)
		Cupule 1	Cupule 2	Cupule 1	Cupule 2	
t= 18h	0,6	Jaune	Jaune	Rouge orangé*	Rouge orangé*	
t= 24h	0,8	Jaune	Jaune	Rose framboise	Rose framboise	Croissance
t= 36h	1,0	Jaune	Jaune	Rose framboise	Rose framboise	Croissance
t= 48h	1.3	Jaune	Jaune	Rose framboise	Rose framboise	Croissance

*la coloration à ce stade était en effet changée sans toutefois apparaitre

Rose framboise.

Tableau IV : Effet de l'inoculum sur l'identification de *M.hominis* à partir de prélèvements pathologiques.

Temps d'incubation(h)	Densité (McF)	Coloration après 48h		Conclusion
		Cupule 1	Cupule 2	
t= 18h	0,5	Rose framboise	Rose framboise	Croissance
t= 24h	0,7	Rose framboise	Rose framboise	Croissance
t= 36h	0,9	Jaune	Jaune	Croissance nulle
t= 48h	1,5	Jaune	Jaune	Croissance nulle

I.3- Lecture de la sensibilité

Tableau V : Effet de l'inoculum sur la sensibilité de *U.urealyticum*

Temps d'incubation(h)	Antibiotiques testés	Coloration après 24h		Conclusion
		Cupule CCI	Cupule CCS	
t= 12h	DOX	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	TET	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	ERY	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	LIN	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	CIP	Jaune	Jaune	SENSIBLE
t= 16h	DOX	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	TET	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	ERY	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	LIN	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	CIP	Jaune	Jaune	SENSIBLE
t= 18h	DOX	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	TET	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	LIN	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT
	ERY	Rouge orangé	Jaune	INTERMEDIAIRE
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	CIP	Rouge orangé	Jaune	INTERMEDIAIRE
t= 24h	DOX	Rouge orange	Rouge orangé	RESISTANT
	TET	Rouge orange	Rouge orangé	RESISTANT
	LIN	Rouge orange	Rouge orangé	RESISTANT
	ERY	Rouge orange	Rouge orangé	RESISTANT
	OFL	Rouge orange	Rouge orangé	RESISTANT
	PEF	Rouge orange	Rouge orangé	RESISTANT
	CIP	Rouge orangé	Rouge orangé	RESISTANT

Tableau VI : Effet de l'inoculum sur la sensibilité de *M. hominis*

Temps d'incubation(h)	Antibiotiques testés	Coloration après 48h		Conclusion
		Cupule CCI	Cupule CCS	
t= 18h	DOX	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	TET	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	ERY	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
	LIN	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	CIP	Jaune	Jaune	SENSIBLE
t= 24h	DOX	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	TET	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	ERY	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
	LIN	Rose framboise	Jaune	INTERMEDIAIRE
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	CIP		Jaune	SENSIBLE
t= 36h	DOX	Rose framboise	Jaune	INTERMEDIAIRE
	TET	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
	ERY	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
	LIN	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Rose framboise	Jaune	INTERMEDIAIRE
	CIP	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
t= 48h	DOX	Rose framboise	Jaune	INTERMEDIAIRE
	TET	Rose framboise	Jaune	INTERMEDIAIRE
	ERY	Rose framboise	Rose framboise	RESISTANT
	LIN	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	OFL	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	PEF	Jaune	Jaune	SENSIBLE
	CIP	Jaune	Jaune	SENSIBLE

II- EXPLOITATION DES RESULTATS ET COMMENTAIRES

Les plaquesensemencées à chaque intervalle de temps comme décrit dans le protocole ont donné au bout de 24h d'incubation (*U. urealyticum*) et de 48h (*M.hominis*) les résultats ci-après.

Les conditions d'interprétation reposaient sur

- Le temps d'incubation requis
- Le changement effectif de coloration dans les deux cupules d'identification
- La couleur requise de la coloration (rouge orangé et rose framboise respectivement).

Ainsi nous avons :

- 99,9% identification excellente
- 99% très bonne identification
- 90% bonne identification
- 80% identification acceptable
- <80% identification inacceptable

☞ Identification *U. urealyticum*

**Tableau VII : Rapport densité de l'inoculum et viabilité des germes
U. urealyticum (milieu solide)**

Densité (McF)	Expression de la viabilité	Conclusion
0,6	Croissance dans les 2 cupules	Population viable
0,7	Croissance dans les 2 cupules	Population viable
0,8	Croissance dans les 2 cupules	Population viable
0,8 =	Croissance dans la cupule 1	La totalité de la population n'est plus viable

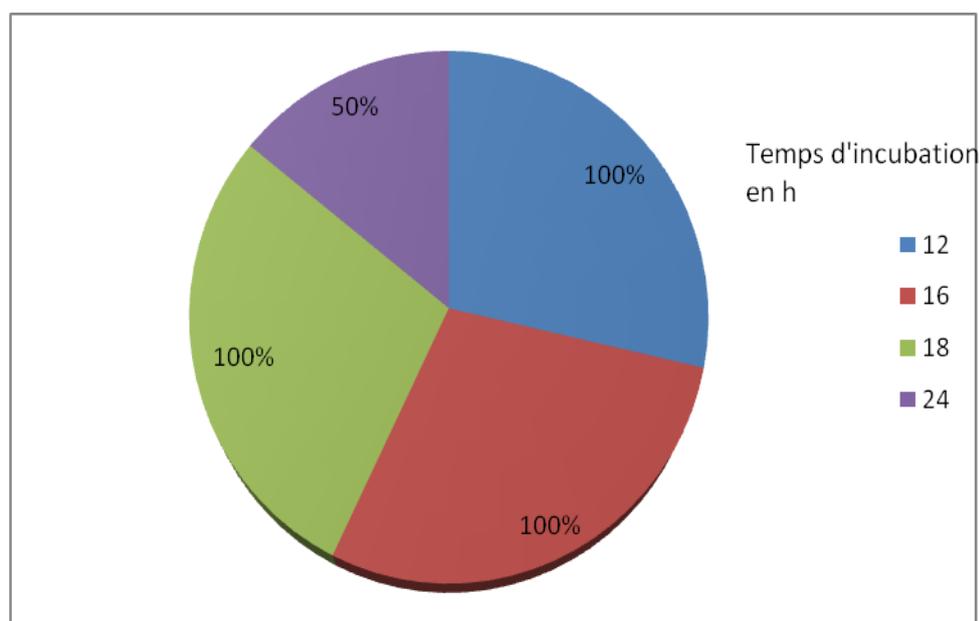


Figure1 : Illustration de l'identification en fonction du temps d'incubation(*U.urealyticum*)

Nous avons observé que à la densité égale à 0,6McF de même qu'à 0,7McF (soit aux temps $t=12h$ et $t=16h$ respectivement) nous obtenons une identification satisfaisante d'espèce. Par ailleurs aux temps $t=18h$ et $t=24h$, on obtient une densité optique identique soit 0,8McF avec cependant une réaction d'identification différente. A $t=18h$ l'on parvient encore à l'identification d'espèce tandis qu'à $t=24h$ la croissance est incomplète ; l'identification d'espèce n'est donc pas obtenue.

Considérant le fait que la D.O mesure la biomasse du milieu sans différencier les germes viables de ceux morts, on peut supposer qu'à ce temps ($t=24h$) la quantité de germes viables n'est pas suffisante pour l'identification convenable d'espèce.

↳ A une densité égale à 0,8McF on ne saurait prédire avec certitude une identification satisfaisante

Tableau VIII : Rapport densité de l'inoculum et viabilité des germes

***U.urealyticum*(prélèvement pathologique)**

Densité (McF)	Expression de viabilité	Conclusion
0,6	Croissance nulle	Population d'étude non viable
1,1	Croissance dans les 2cupules	Population viable
1,3	Croissance dans les 2cupules	Population viable
1,9	Croissance nulle	Population d'étude non viable

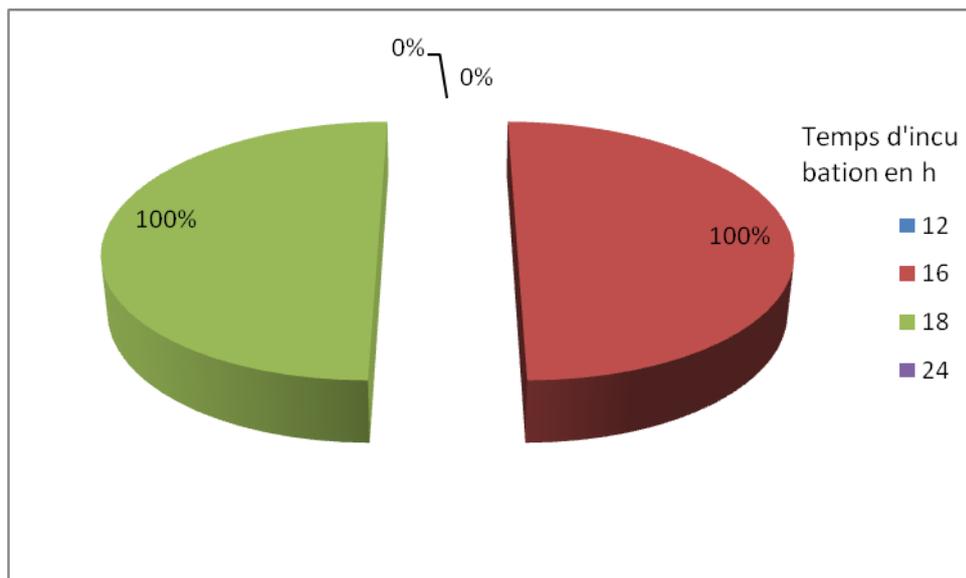


Figure2 : Illustration de l'identification en fonction du temps d'incubation(*U.urealyticum*)

Pour les mêmes quantités, incubées aux mêmes temps, les inocula préparés à partir de prélèvements pathologiques présentent une figure différente. C'est aux temps $t=16h$ et $t=18h$ que nous avons obtenu une identification d'espèce malgré des D.O plus élevées 1,1 et 1,3 respectivement.

Il convient de noter à ce stade quelques remarques :

1. La valeur plus élevée des D.O met certainement en évidence la présence d'une population plurielle capable de coloniser la flore vaginale.
2. Cette population autre que *U.urealyticum* pourrait éventuellement contribuer à la variation du pH du milieu en présence du substrat.
3. Cette population masquerait peut-être uniquement la présence effective de *U.urealyticum* faisant augmenter la D.O sans effet quelconque sur la réaction ; ce qui expliquerait par exemple une densité de 0,6 McF avec une croissance nulle.

☞ Identification *M.hominis*

Tableau IX : Rapport densité de l'inoculum et viabilité des germes

M.hominis (milieu solide)

Densité (McF)	Expression de viabilité	Conclusion
0,6	Modification du pH	
0,8	croissance dans les 2 cupules	Population viable
1,0	croissance dans les 2 cupules	Population viable
1,3	croissance dans les 2 cupules	Population viable

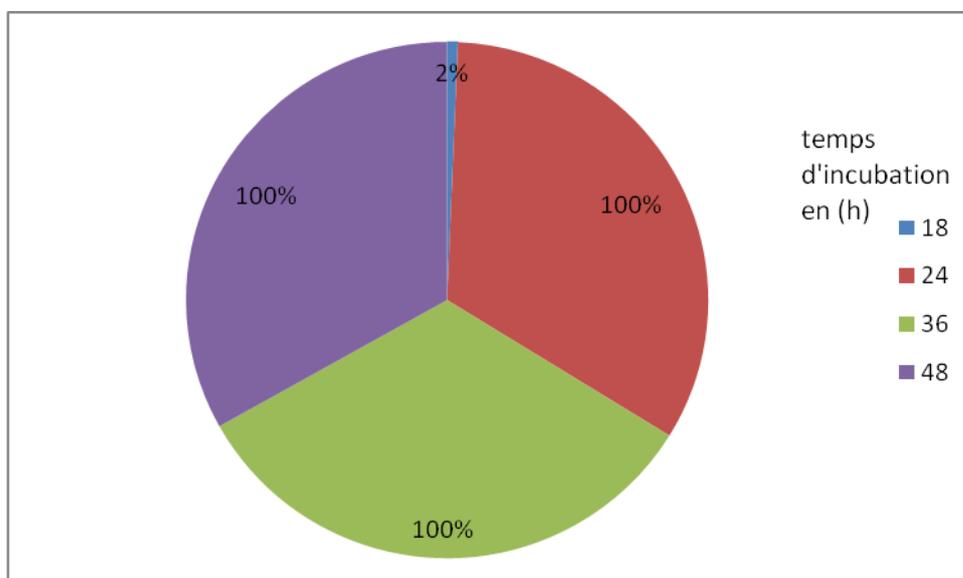


Figure3 :Illustration de l'Identification en fonction du temps d'incubation(*M. hominis*)

Pour ce qui est de *M. hominis* les densités correspondant à une identification satisfaisante d'espèce sont comprises entre [0,8 -1,3] obtenues après des temps d'incubation respectifs de t=24h, t=36h et t=48h.

Nous notons par ailleurs qu'à t=18h soit une D.O= 0,6McF nous avons obtenu un changement de coloration (rouge orangé) du milieu réactionnel bien que n'étant pas celui requis (rose framboise) pour l'identification correcte d'espèce.

Il en ressort que :

↳ A une D.O de 0,6 McF l'identification de *M. hominis* n'est pas satisfaisante

Tableau X : Rapport densité de l'inoculum et viabilité des germes

***M.hominis* (prélèvements Pathologiques)**

Densité (McF)	Expression de la viabilité	Conclusion
0,5	Croissance dans les 2 cupules	Population viable
0,7	Croissance dans les 2 cupules	Population viable
0,9	Croissance nulle	Population d'étude non viable
1,5	Croissance nulle	Population d'étude non viable

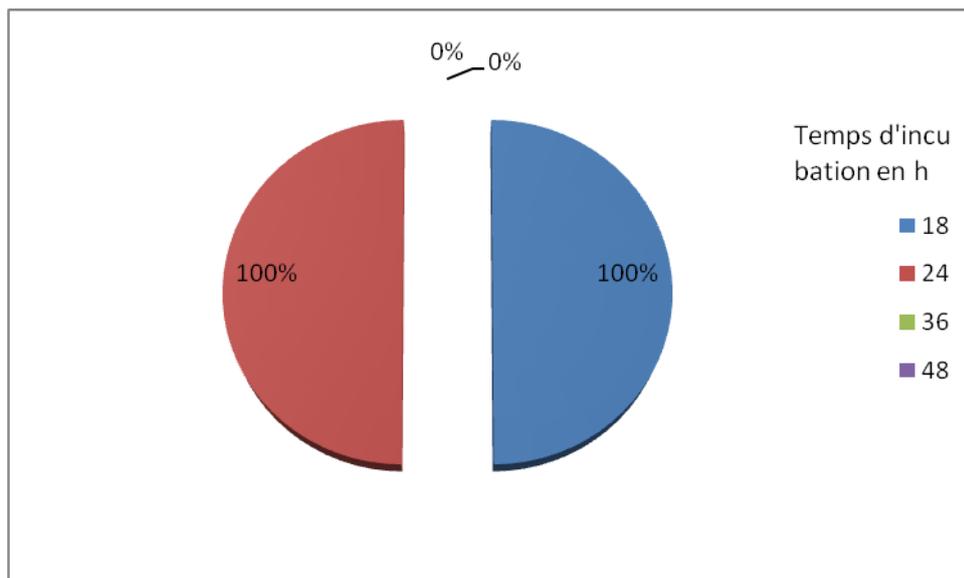


Figure4 : Illustration de l'identification d'espèce en fonction du temps d'incubation(*M.hominis*)

S'agissant d'inocula préparés à partir de prélèvements pathologiques, on a observé un virage de la coloration à la D.O =0,5 McF de même qu'à 0,7McF. Cependant il convient de noter qu'à partir de souche pure, à D.O=0,6McF, la même réaction dans les mêmes conditions étaient négative. Ceci suggère une fois de plus la présence de germes autres que ceux étudiés (*M. hominis* en l'occurrence) dans les prélèvements pathologiques et capables de faux positifs.

Il est à noter également que les D.O obtenues à partir des prélèvements pathologiques étaient variables d'un prélèvement à l'autre, probablement fonction de l'état des sécrétions vaginales propre à chaque sujet. Les valeurs retenues ici sont celles qui ont montré une répétabilité d'environ 92% dans notre étude.

☞ Sensibilité

Dans l'optique de pouvoir clairement évaluer l'effet de l'inoculum, il nous a été nécessaire d'établir au préalable le profil de sensibilité des souches soumises à notre étude.

Tableau XI : Lecture du profil de sensibilité de la souche *U.urealyticum* étudiée

Antibiotiques testés	Profil de sensibilité
DOX	Sensible
TET	Sensible
ERY	Résistant
LIN	Résistant
OFL	Sensible
PEF	Sensible
CIP	Sensible

Par ailleurs dans le but de pouvoir déterminer la concentration correspondant à chaque inoculum au bout d'un temps d'incubation donné, nous avons exploité les concentrations connues de la gamme d'étalonnage précédemment préparée afin de tracer la droite correspondante ; donnant le titre en Unité de changement de couleur par ml (ucc/ml) en fonction de la DO.

Exemple de calcul pour un temps d'incubation donné :

Pour t= 16h on a d'après les résultats consignés dans le tableau ci-dessous 5/7 caractères correspondants. La concordance s'obtient d'après le calcul suivant sachant pour 7/7 caractères correspondant on a 100% :

$$5/7 \times 100 = 71,42 \%$$

Tableau XII : concordance du profil de sensibilité en fonction de l'inoculum (*U.urealyticum*)

Tps(h) et inocula Correspondants Antibiotiques testés ucc/ml	12h	16h	18h	24h	Profil de sensibilité de <i>U. urealyticum</i>
	0,6McF 10 ⁵	0,7McF 10 ⁴	0,8McF 5×10 ³	0,8McF 5×10 ³	
DOX	+	-	-	-	+
TET	+	-	-	-	+
ERY	-	-	-	-	-
LIN	-	-	0	-	-
OFL	+	+	+	-	+
PEF	+	+	+	-	+
CIP	+	+	0	-	+
Concordance	100%	71,42%	42,85%	0%	100%

+ = sensible

- = résistant

0 = intermédiaire

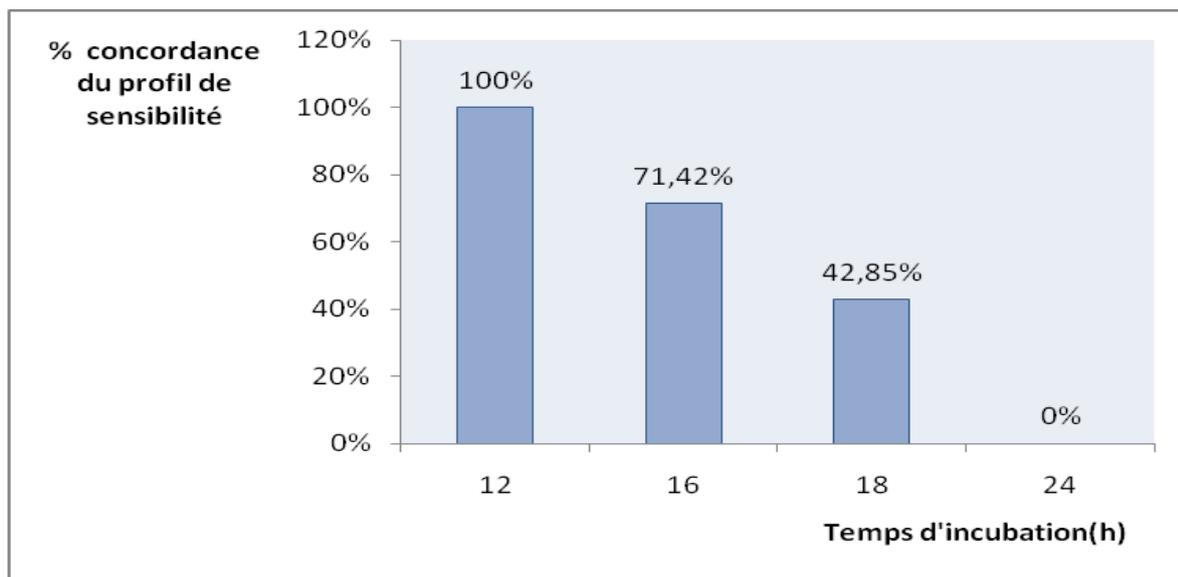


Figure5 : Concordance du profil de sensibilité en fonction de l'inoculum(*U.urealyticum*)

Aux inocula 0,8McF correspondant aux temps $t= 18h$ e $t= 24h$, le profil de sensibilité était non satisfaisant voire inacceptable ; l'action des antibiotiques étant peu ou pas du tout efficace.

L'inoculum correspondant à 0,7McF ($t= 16h$) est jugé peu satisfaisant car étant inférieur à 80% et bien que ne montrant que les cyclines comme ne répondant pas à l'inactivation des germes par rapport au profil de référence.

L'inoculum correspondant à 0,6McF a reproduit textuellement le profil de sensibilité de référence et se révèle ainsi très satisfaisant.

Tableau XIII : Lecture du profil de sensibilité de la souche de *M.hominis* étudiée

Antibiotiques testés	Profil de sensibilité
DOX	Sensible
TET	Sensible
ERY	Résistant
LIN	Sensible
PEF	Sensible
CIP	Sensible

Tableau XIV : Concordance du profil de sensibilité en fonction de l'inoculum(*M.hominis*)

Tps(h) et inocula correspondants Antibiotiques testés ucc/ml	18h	24h	36h	48h	Profil de sensibilité de <i>M.hominis</i>
	0,6McF 10 ⁵	0,8McF 10 ³	1,0McF 10 ¹	1,3McF 10 ⁻²	
DOX	+	+	0	0	+
TET	+	+	-	0	+
ERY	-	-	-	-	-
LIN	+	0	-	+	+
OFL	+	+	+	+	+
PEF	+	+	0	+	+
CIP	+	+	-	+	+
Concordance	100%	85,71%	28,57%	71,42%	100%

L'évolution de la concordance du profil de sensibilité en fonction du temps d'incubation (et donc par conséquent de la taille de l'inoculum) est illustrée par la figure ci-dessous :



Figure 6 : Concordance du profil de sensibilité en fonction de l'inoculum (*M. hominis*)

A $t=18h$ nous obtenons une excellente concordance du profil de sensibilité de la souche étudiée.

A $t=24h$ soit 6h plus tard, le profil se révèle concordant à 85,71% ; ce qui est acceptable. En revanche le profil obtenu à $t=36h$ présente une concordance très insuffisante voire inacceptable ; soit à 18h de t_0 . Entre $t=36h$ et $t=48h$ on passe de 28,57% à 71,42% de concordance. Sachant que le processus de croissance des germes bactériens présente environ 7phases (4) consécutives (latence-accelération-croissance exponentielle- ralentissement-phase stationnaire-décroissance-mortalité logarithmique), ce pourcentage pourrait s'expliquer par le fait que la population se trouverait en phase [6] (décroissance) à $t=48h$. Soit donc qu'entre 36h et 48h, la population aura passée les phases stationnaire [5] et de ralentissement [4] d'où une augmentation de la biomasse, car en phase [4] de ralentissement il y a croissance bien qu'elle soit décélérée. En phase [6] la mort ou lyse des bactéries n'influence pas la biomasse mais en revanche la concentration de germes viables et donc par conséquent le profil de sensibilité. Il y aurait ainsi moins de germes viables à $t=48h$ qu'à $t=36h$ de sorte que les

antibiotiques parviennent parfaitement à inhiber leur croissance. Il en ressort qu'outre le fait que 71,42% n'est pas un taux significatif pour en conclure une concordance satisfaisante, le profil obtenu à t=48h ne fournit pas une bonne appréciation de l'activité antibiotique.

II.1 Validation de la méthode

Etant donné les paramètres de détermination nécessaire à l'exploitation de la droite de régression linéaire, mais aussi le nombre réduit des caractères nécessaire à l'identification des espèces de mycoplasmes urogénitaux étudiées, nous avons choisi d'appliquer la validation de cette méthode à l'étape de la sensibilité. Etant entendu que les inocula sont strictement les mêmes pour chaque espèce respectivement.

☞ Détermination de la droite de régression linéaire

La régression linéaire consiste à déterminer une estimation des valeurs a et b et à quantifier la validité de cette relation grâce au coefficient de corrélation linéaire. La droite de régression fournit ainsi une idée schématique mais souvent très utile de la relation entre deux variables. Elle permet donc facilement d'apprécier comment évolue l'une des variables (le critère) par rapport à l'autre (le prédicteur)

Pour faire la prédiction il s'agira de substituer la valeur donnée à x dans l'équation de régression et de calculer la valeur correspondant à y.

Cette droite est donnée par l'équation :

$$Y' = ax + b$$

Où a et b sont des constantes données par les formules suivantes :

$$a = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} \quad b = \frac{\sum Y}{N} - a \frac{\sum X}{N}$$

$x = \log [n]$

$y = c$

X et y sont des variables permettant notamment de calculer le coefficient de corrélation r à partir du coefficient de détermination. Ce dernier noté ρ^2 (population) ou r^2 (échantillon) est une mesure de la proportion de la variation de la variable y s'expliquant par les variations de x.

Le coefficient de corrélation lui, est tout simplement la racine carré du coefficient de détermination ; noté ρ ou r il est donné par la formule :

$$r = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[N(\sum X^2 - (\sum X)^2)] [N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Plus la valeur de r se rapproche de ± 1 , plus la relation linéaire est forte ; et plus la valeur de r se rapproche de 0 plus la relation linéaire est faible.

r = coefficient de corrélation;

x_i = données observées

a = pente de la droite;

b = ordonnée à l'origine

n = concentration inocula;

C = concordance des caractères

Y' = données à l'ordonnée de la droite de régression

N = nombre de paires (x ; y) utilisées pour calculer la droite de concordance.

Critères d'interprétation de «r » et de « a »

$r = 0,2$ à $0,4$: Corrélation faible ou quasi absence de corrélation.

$r = 0,4$ à $0,6$: Corrélation moyenne.

$r = 0,6$ à $0,8$: Bonne corrélation.

$r = 0,8$: Corrélation élevée.

$r = 1$ où -1 : Corrélation parfaite

$a = 0$: pas de corrélation

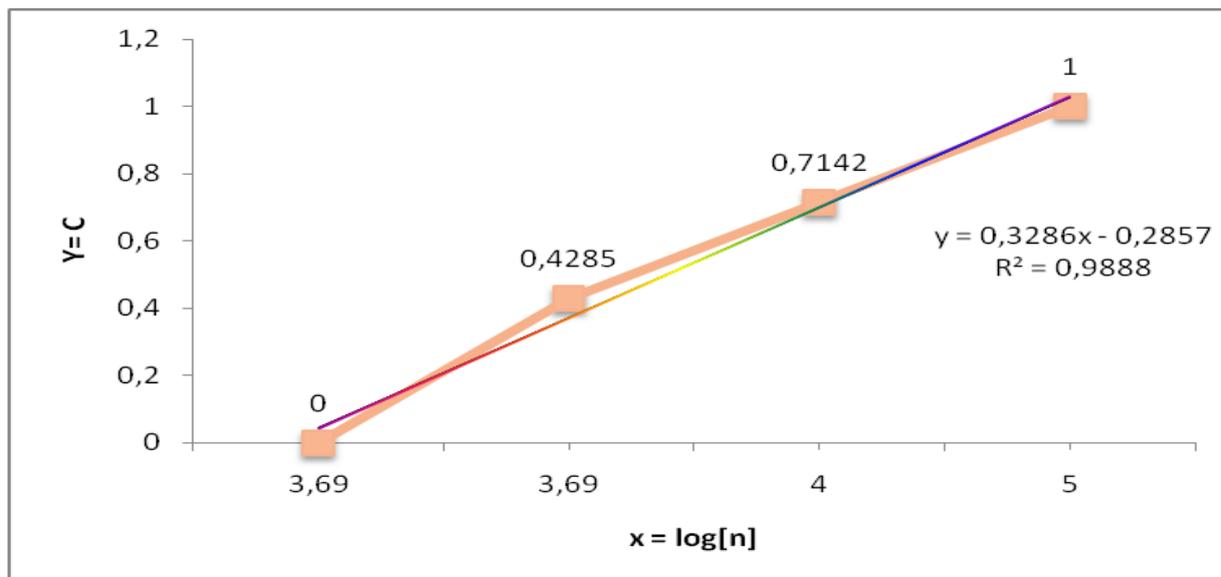
$a < 0$: corrélation négative

$a > 0$: corrélation positive

☞ *U. urealyticum*

Tableau xv : Résultats de *U. urealyticum* aux temps d'incubation t (12h, 16h, 18h et 24h)

Concentration inocula ucc/ml	10^5	10^4	5×10^3	5×10^3
Concordance des caractères %	100	71,42	42,85	0
$x = \log [n]$	5	4	3,69	3,69
$Y = C$	1	0,7142	0,4285	0
a	0,3286			
b	-0,2857			
y	1,35	1,02	0,92	0,92
r	0,99			



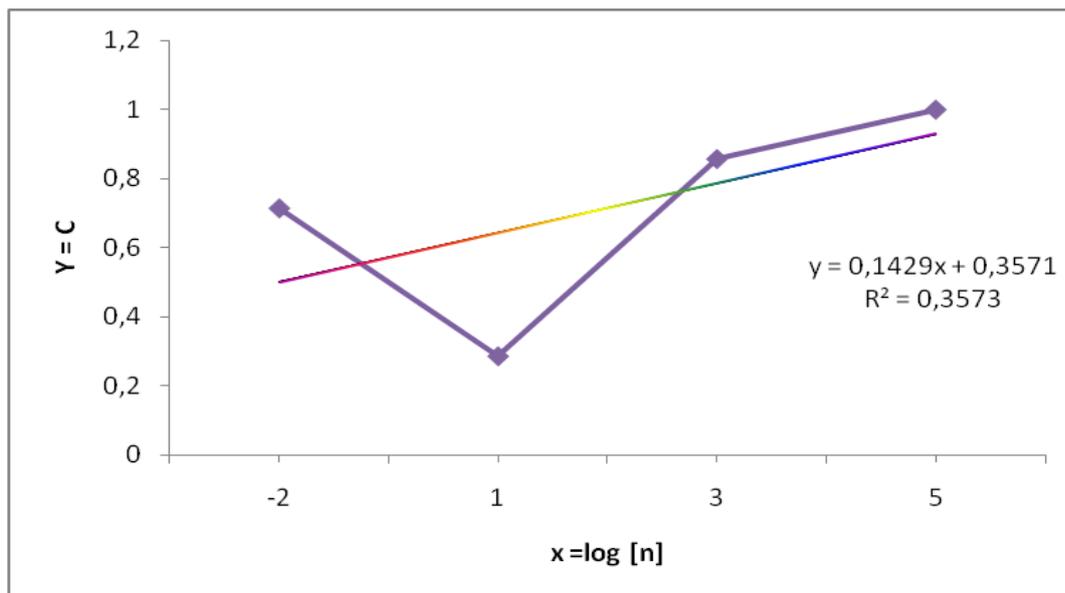
La droite de régression montre une bonne corrélation entre la taille de l'inoculum et la concordance du profil de sensibilité avec un coefficient de corrélation $r=0,99$ et une équation de droite de type $y= 0,3286x + (-0,2857)$.

On peut donc parler de relation linéaire forte, ou de corrélation élevée et positive.

☞ *M. hominis*

TABLEAU XVI : Résultats de *M.hominis* aux temps d'incubation t (18h, 24h, 36h et 48h)

Concentration inocula ucc/ml	10^5	10^3	10^1	10^{-2}
Concordance des caractères %	100	85,71	28,57	71,42
x=log [n]	5	3	1	-2
Y= C	1	0,8571	0,2857	0,7142
A	0,1429			
B	0,3571			
Y	1,07	0,78	0,5	0,07
R	0,597			



La droite de régression montre une bonne corrélation entre la taille de l'inoculum et la concordance du profil de sensibilité avec un coefficient de corrélation $r=0,597$ sensiblement égal à **0,60** et une équation de droite de type $y= 0,1429x + 0,3571$.

On peut donc parler de corrélation linéaire moyenne et positive, à la limite de la bonne corrélation.

II.2- Discussion

1. Origine des souches

Dans cette étude, l'échantillonnage devait concerner des souches de référence à défaut desquelles nous avons utilisé des souches de contrôle. D'autre part, afin de pouvoir établir une comparaison avec les méthodes d'isolement de routine, il nous fallait disposer d'échantillons de prélèvements pathologiques. Nous nous sommes contentés d'une huitaine d'échantillons que nous avons sélectionnés sur la base du critère de la positivité avec un titre $\geq 10^4$ UCC/ml, à *M.hominis*, *U.urealyticum* ou les deux.

Il aurait sans doute été préférable de n'avoir que des échantillons pathologiques à une seule espèce ; mais la réalité du terrain a montré une prédominance de l'espèce *U.urealyticum* seule ou alors une association des deux germes. Les prélèvements provenaient de patients reçus à l'institut Pasteur de Dakar, identifiés, testés et conservés pendant 48h maximum.

Une recherche préalable a été faite afin d'établir un échantillon témoin d'étude pour chaque germe, étant donné que la densité à l'échelle de McFarland était variable d'un prélèvement à l'autre, sans doute en fonction de la composition de chaque flore génitale. Cet échantillon d'étude a été déterminé en fonction de la prédominance moyenne d'un type par rapport aux autres. Cette étape nous a été particulièrement délicate et difficile à déterminer d'autant que les échantillons choisis étaient pris au hasard sur le seul critère de la positivité à l'un ou aux deux germes pour un titre $\geq 10^4$ UCC/ml.

2. CSB système mycoplasme

L'identification, de même que la sensibilité ont été étudiées par la Microméthode CSB Myco.

Ces microplaques d'identification et de sensibilité ont été validées par des études de stabilité, d'efficacité et de reproductibilité avant leur utilisation. Plusieurs travaux précédemment effectués en ont également approuvés et confirmés la sensibilité, la spécificité de même que la reproductibilité et la facilité d'exécution. Elle a été comparée aux méthodes classiques d'identification et d'étude de sensibilité des mycoplasmes avec une bonne corrélation (34,64)

Par ailleurs nous avons également tenu dans notre étude à comparer nos résultats (identification, profil de sensibilité des souches de contrôle et des prélèvements) à ceux obtenus avec les kits Mycoplasme IST 2 (Biomérieux) à l'institut Pasteur de Dakar.

Nous avons également trouvé une bonne corrélation du moins pour les molécules identiques : nous n'avions pas le même panel d'antibiotiques (ce kit teste outre DOX, TET, OFL, ERY, CIP, la Josamycine, l'Azythromycine, la Clarythromycine et la Pristinamycine.)

3. La recherche de l'effet de l'inoculum

➤ Isolement sur gélose A₇

Dans notre étude, il importait d'une part de s'assurer de la pureté de nos souches afin d'éviter toute erreur d'interprétation due à la présence de micro-organismes autres que les mycoplasmes. D'autre part il nous fallait mettre en regard les processus d'isolement, d'identification, de sensibilité tels que réalisés en routine et à partir des colonies isolées sur milieu solide. C'est à ce stade qu'il était nécessaire d'obtenir des échantillons pathologiques afin de mener une étude comparative, du moins pour ce qui est de l'effet de l'inoculum sur l'identification.

Les différences notées sur l'identification par les inocula préparés à partir de micro-organismes isolés sur milieu solide et ceux préparés à partir des prélèvements pathologiques et transportés directement sur bouillon A₃ témoignent de la nécessité d'objectiver la présence de ces micro-organismes sur gélose A₇; car le virage de l'indicateur coloré ne signe pas exclusivement la présence d'un mycoplasme.

Par ailleurs au cours de notre expérimentation, il nous aura été donné de constater que les germes isolés sur gélose A₇ puis transportés et conservés dans du bouillon A₃ à 20°C se conservaient mieux et plus longtemps que les germes obtenus de prélèvements pathologiques et introduit directement dans du bouillon A₃. Ces derniers non seulement ne résistent pas longtemps mais de plus peuvent héberger d'autres micro-organismes susceptibles de fausser les résultats.

Nous avons ainsi observé une conservation tout à fait satisfaisante à 20°C des souches obtenues sur gélose pendant la durée de notre expérience, soit donc 2mois. Il convient de préciser qu'il serait intéressant de pousser l'observation au-delà des 2 mois que nous avons pu y consacrer. En revanche sur bouillon A₃, les germes issus du prélèvement pathologique résistent environ 48h à +4°C et ± 2 semaines à +20°C en évitant toute décongélation-recongélation.

➤ Le choix de l'inoculum

Les difficultés rencontrées dans cette étape pour chaque souche, étaient de trouver la dilution convenable à partir de laquelle on pouvait travailler. Il fallait réussir le choix d'un inoculum qui nous permette d'étudier le comportement des espèces à des temps variables d'incubation, tout en démontrant que le résultat obtenu est effectivement fonction de l'inoculum d'ensemencement de départ.

Et donc pour pouvoir observer une évolution de la croissance, il nous a paru judicieux de partir d'une dilution négative afin de démontrer l'implication et l'effet du temps d'incubation sur la taille de l'inoculum et donc par conséquent sur les résultats d'identification et de sensibilité.

➤ Le choix des différents temps d'incubation

Dans la pratique, étant donné que *U.urealyticum* comme *M.hominis* ne sont identifiés qu'au bout de 24 à 48h, il nous a semblé judicieux d'espacer suffisamment les différents temps d'incubation dans un intervalle de 24h pour *U.urealyticum* et 48h pour *M.hominis* afin

d'observer une évolution de la taille de l'inoculum au cours de l'expérimentation. Les données existantes nous renseignant peu sur leur cycle de multiplication, aussi nous sommes nous inspirés des seules données renseignées ; celles de *M.pneumoniae* (son cycle de multiplication étant de 5-6h) (31)

Les différents temps observés résultent donc d'un choix aléatoire bien que défini dans un intervalle précis, ce qui suggère peut être une possibilité d'amélioration des résultats obtenus ici en fonction d'un choix différent des durées d'incubation.

4. Sensibilité : le choix des antibiotiques testés

➤ Présentation de la galerie ABG Myco Micro CSB

Dox		TET		ERY		LIN	
Cci	Ccs	cci	ccs	cci	Ccs	cci	ccs
Cci	Ccs	cci	ccs	cci	Ccs		
OFL		PEF		CIP		TC	

TC= cupule témoin

cci=cupule contenant la concentration critique inférieur

ccs=cupule contenant la concentration critique supérieur

Les antibiotiques testés au cours de ce travail sont ceux répertoriés dans la galerie ABG Myco MicroCSB. Il s'agit de trois familles d'antibiotique connus comme étant potentiellement actifs sur les mycoplasmes. (7,8)

➤ Les cyclines

Les cyclines appartiennent aux antibiotiques de première ligne utilisés pour le traitement des infections urogénitales causées par *M.hominis* et *U.urealyticum* (30,8). La recrudescence de cas de résistance de plus en plus nombreux survenus ces dernières années et confirmés par plusieurs études(30,90) justifie ici de la nécessité d'inclure ces molécules dans le choix des antibiotiques testés pour l'étude de la sensibilité des mycoplasmes.

➤ Les macrolides

Plus précisément les MLS, sont une classe d'antibiotique couramment utilisées pour le traitement des infections urogénitales de même que celles du tractus respiratoire causées par les mycoplasmes (75). En outre *M. hominis* s'est révélé naturellement résistant aux macrolides de 14- 15 atomes de carbones tel que l'érythromycine alors qu'il reste sensible aux macrolides de 16 atomes et plus tels que la lincomycine ; inversement pour *U.urealyticum* qui présente une résistance à cette dernière. (7)

Le choix de ces deux molécules apparait donc évident pour tout test de sensibilité des mycoplasmes.

➤ Les quinolones

Le choix des quinolones dans la galerie d'antibiotiques testés s'explique par le fait qu'il s'agisse d'une famille prometteuse dans la démarche thérapeutique pour le traitement des infections dues aux mycoplasmes urogénitales (90). Par

ailleurs certaines études ayant notamment explorés l'action de la ciprofloxacine, de l'ofloxacine et de la pefloxacine entre autres, ont conclu à une bonne sensibilité de ces molécules sur les mycoplasmes pathogènes humains (80) tandis que quelques autres études révèlent plus ou moins des cas de résistance acquises (50, 58,88).

Il apparait donc en somme que les antibiotiques adoptés par la Microméthode CSB Myco et testés dans notre étude appartiennent aux familles d'antibiotiques à ce jour connus comme pouvant agir contre les mycoplasmes, agents d'infections urogénitales notamment mais aussi connus comme pouvant révéler des résistances acquises, ce qui en font des molécules d'un intérêt certain dans l'exploration du schéma thérapeutique à instaurer contre les mycoplasmes.

5. La validation

La validation a pour principale objectif de s'assurer qu'un test microbiologique donné procurera des résultats suffisamment fiables et reproductibles compte-tenu du but de l'analyse.

Nous avons pour cela choisi d'utiliser la droite de régression, qui est un diagramme de dispersion qui renseigne sur l'existence d'une relation linéaire entre les variables, en vue d'une prédiction. Nous avons tenté d'établir une relation entre la concordance du profil de sensibilité après identification d'espèce et les inocula ayant servi à leur obtention. Pour les espèces étudiées, nous avons obtenus les résultats suivants :

- *U.urealyticum* $y = 0,3286x - 0,2857$
 $r=0,99$
- *M.hominis* $y = 0,1429x + 0,3571$
 $r = 0,59$

Nous pouvons constater que les différentes valeurs de **a** obtenues sont positives et donc traduisent une corrélation positive. Par ailleurs la valeur trouvée du coefficient de corrélation témoigne d'une bonne corrélation et ce d'autant plus que l'on se rapproche de 1.

CONCLUSION

Le rôle joué par *M.hominis* et *U.urealyticum* dans les maladies infectieuses non seulement de l'adulte mais aussi du nouveau né est de nos jours de mieux en mieux connu, malgré les données peu nombreuses dont on dispose quant à leur incidence précise.

Chez l'adulte *U.urealyticum* est principalement impliqué dans l'étiologie des UNG, il est également le plus souvent mis en cause dans la chorioamniotite histologique malgré l'existence de résultats contradictoires entre l'infection et l'issue de la grossesse. *M.hominis* est quant à lui le plus souvent mis en cause dans les septicémies du post -partum et les endométrites.

Chez le nouveau-né, les mycoplasmes urogénitaux occupent une place à part entière principalement dans les infections respiratoires chez les prématurés présentant un faible poids à la naissance. De plus devant des symptômes d'atteinte méningée et la présence d'une pléiocytose inexplicée au niveau du

LCR du nouveau-né, la recherche de *U.urealyticum* et *M.hominis* doit être envisagée.

Dans la pratique, le diagnostic et le traitement des infections dues aux mycoplasmes urogénitaux doivent s'appuyer sur l'isolement de ces micro-organismes par culture à partir du site affecté et sur des méthodes précises.

Ce travail a été initié à l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactério-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec entre juin 2008 et octobre 2009. Il a porté sur des souches de contrôle d'*U.urealyticum* et *M.hominis* et une huitaine de souches issues de prélèvements pathologiques isolées et identifiées à l'institut Pasteur de Dakar en vue d'établir une comparaison.

Les objectifs de cette étude étaient de parvenir à trouver un inoculum pouvant garantir une identification satisfaisante de ces micro-organismes, mais aussi une évaluation convenable de leur sensibilité aux antibiotiques par la Microméthode CSB Myco. Elle nous aura également permis de resouligner la pertinence que revêt le caractère commensal dans le tractus urogénital de ces espèces quelque fois injustement incriminées ;notamment lorsque la culture sur gélose n'apporte pas la certitude de leur présence.

Il en ressort pour *U.urealyticum* qu'un inoculum d'une densité correspondant à **[0,6 - 0,8]** à l'échelle de McFarland fournit une identification satisfaisante.

Pour *M.hominis* un inoculum de densité **[0,8 – 1,3]** à l'échelle de McFarland fournit une identification satisfaisante.

Rapporté aux prélèvements pathologiques, il apparaît clair que la taille de l'échantillon paraît ne pas constituer un témoin assez exhaustif pour donner ici une conclusion définitive bien que nous retiendrons la différence quasi constante des résultats obtenus ; par comparaison avec les inocula de souches sur milieu solide.

Pour ce qui est de l'étude de la sensibilité, l'inoculum correspondant à **0,6** à l'échelle de **McFarland** s'est révélé pour les deux espèces parfaitement (100%) convenable.

Cette étude a été menée dans la perspective de contribuer à l'amélioration des conditions d'utilisation des Microméthodes d'identification et de sensibilité des mycoplasmes par la Microméthode CSB myco. Nous espérons avoir apporté un plus aux études précédemment menées et qui suggéraient une standardisation de l'inoculum.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. APERE H., SARLANGUE J., RENAUDIN H., BILLEAUD C., BEBEAR C., SANDLER B.
Infection materno-fœtale à mycoplasmes génitaux. *Pédiatrie* 1993, **48** : 297-299.
2. AUJARD Y., MAURY L., DOIT C., MARIANI-KURKDJIAN P., BAUD O., FAMOUX C., BINGEN E.
Archive de pediatrie: (Paris) [arch.Pédiatr. : (Paris).] 2005,vol . **12**.
3. AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H.
Mycoplasma-Ureaplasma, Bactériologie clinique Edition Ellipses, Paris, 1988, **39**,481-491.
4. BALLE B.
Microméthode d'étude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux. Thèse de pharm. Dakar, 1999, N° **48**.
5. BEBEAR C.
Les infections à mycoplasmes en gynécologie obstétrique.

6. BEBEAR C.

Les infections à mycoplasmes génitaux- Rev. Eur.Dermatol. MST, 1990, **2**, ,7-14.

7. BEBEAR C., de BARBEYRAC B.

Mycoplasmes. In: Manuel de Bacteriologie Clinique. FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C. (Eds) Elsevier, Paris 1994, **3** :1443-1463.

8. BEBEAR C.M., and I KEMPF

Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance 2005, P.535-568.In A Blanchard and G F Browning (ed.), Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control. Horizon bioscience, Wymondham, United Kingdom.

9. BEBEAR C., KHALEF A., ROCHE M.C., CANTET P., MALEVILLE J., LATRILLE J.

Infections urogénitales et mycoplasmes- Sem. Hôp. Paris, 1978, **54** : 107-111.

10. BEBEAR C., LATRILLE J.

Mycoplasmes- Bactériologie médicale Léon -Le Minor, ED. Flammarion Paris, 1990, 1088-1097.

11. BEBEAR C.

Revue européenne de dermatologie et de MST. [Rev. Eur. Dermatol. MST.], 1991, vol **3**, N°6, 307-314.

12. BEECHAM H J., LO S C., LEWIS D E., COMER S W., RILEY K J., OLDFIELD E C.

Recovery from fulminant infection with *Mycoplasma fermentans* (incognitusstrain) in non immunocompromized host. *Lancet*1991, **338**: 1014-1015.

13. BONISSOL CH.

Biologie des mycoplasmes. Bull .Mem.Soc.Med, Paris, Tome III N°6.

14. BOUDRY P.

Louvain médical. [Louvain méd.] 1998, vol **117**, N° 4, pp 128-141.

15. BRES P. RAOULT D.

Les mycoplasmes 89ème congrès ASM. Lettre Infect., Tome IV, 1989, **14**, 553-554.

16. BRIDE J., DONATIEN A.

Le microbe de l'agalactie contagieuse et sa culture in vitro. CR. Acad. Sci., 1923, **177**, 841.

17. BRUNNER H., WEIDNER W., SCHIEFER H.G.
Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis.
18. CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGIE
august 2001, vol **47**, Number 8, pp 691-697.
19. CASSELL G.H., *et al.*
Association of *Ureaplasma urealyticum* infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth weight infants. *Lancet* ii: 1988, 240-244.
20. CASSEL G.H., COLE B.C.
Mycoplasmas as agent of human diseases. *N.Engl J.Med.* 1981, **304**, 80-89.
21. CASSELL G.H., CROUSE D.T., WAITES K.B., RUDD P.T., DAVIS J.K.
Does *Ureaplasma urealyticum* cause respiratory disease in newborns? *Pediatr Infect Dis* , 1988, **7** : 535-541.
22. CASSELL G.H., WAITES K.B., CROUSE D.T.
Perinatal mycoplasmal infections. *Clin Perinatol*, 1991, **18** : 241-262.
23. CATALANE F., LEVENTIS S., KHOURY B., SIBOULET A.
A propos des infections à Mycoplasmes : Application pratique au diagnostic des MST. Inst. ALFRED FOURNIER, Paris, 1984, **101**, 21-34.
24. CHANOCK R.M., HAYFLICK L., BARILE M.F.
Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumoniae and its identification as a PPLD. *Proc.Nat.Acad.Sci.Wash*, 1962, **48**, 41-49.
25. CHOWDURY I.H., MUNAKATA T., KOYANAGI Y...
Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro: a possible cofactor responsible for the progression of AIDS. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 1990, **170**, 1365-1370.
26. CLYDE W.A.Jr., KENNY G.E., SCHACHTER J.
Laboratory diagnosis of chlamydial and mycoplasmal infections In: Drew W.L. *Cumitech* ASM, Washington DC, 1984, **54**, 1-19.
27. COPIN E., LEBRUN L.
Infections à Mycoplasmes urogénitales *Feuill. Biol.* 1991, **181**, 9-1.

28. DA SILVA O., GREGSON D., HAMMERBERG O.
Role of *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in development of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis*, 1997, **J 16** : 364-369.
29. DAN M., SAMRA Z., KATZ A., DEBBY A., GUTMAN R., ZAKUT H.
Etiology of acute pelvic inflammatory disease proven by laparoscopy. *Sex Transm Dis* 1993, **20 (3)**:158-163.
30. DEGRANGE S., RENAUDIN H., CHARRON A., BEBEAR C. and BEBEAR C.M.
Tetracycline resistance in *Ureaplasma spp* and *Mycoplasma hominis* :prevalence in Bordeaux,France from 1999 to 2002, and description of two tet(M)-positive isolates of *M.hominis* susceptible to Tetracyclines 03/2008, **52(2)** 742-4.
31. DENIS F.
Mycoplasmes CES de Bactériologie - Virologie clinique Dakar 1978.
32. DIENES L., ESDALL G.
Observation on the L organisms of KLIENEBERGER *Pror.Soc.Exp.Biol.Med.*, 1937, **56**,740-744.
33. DIENG SARR.
Les Mycoplasmes CES Bactériologie-virologie.
34. DIOH H.D.D.
Standardisation et évaluation de microméthodes d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de différentes espèces de Mycoplasmes.Thèse Pharm : Dakar, 1998, n°**54**.
35. DURIN N.
Les Nouvelles Dermatologiques[Nouv. Dermatol.] :Infections génitales à mycoplasmes,vol**24** ,n° 4 pp.19-20.
36. DYBVIG K., VOEKER L.L.
Molecular biology of Mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol*1996, **50**: 25-57.
37. EATON M.D., MEIKLE JOHN G., GERICK W.
Studies on the etiology of primary atypical pneumoniae. A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos- *J.Exp.Med.* , 1944, **79**, 649-668.
38. EMBREE J.E., KRAUSE V.W., EMBIL J.A., MACDONALD S.
Placental infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*: clinical

correlation. *Obstet Gynecol*1980, **56**: 475-481.

39. ESCHENBACH D.A.

Ureaplasma urealyticum as a cause of postpartum fever. *Pediatr Infect Dis*1986,**5(Suppl)**:258

40. ESCHENBACH D.A., NUGENT R.P., RAO V.

A randomized placebo-controlled trial of erythromycin for the treatment of *Ureaplasma urealyticum* to prevent premature delivery. *Am J Obstet*1991, **164**: 734-742.

41. FOWLKES D.M., MACLEOD J., O'LEARY W.M.

T-mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters. *Fertil Steril* 1975,**26 (12)**: 1212-1218.

42. FRANÇOIS DENIS., MARIE-CECILE ROY., CHRISTIAN MARTIN...

Bactériologie médicale : techniques usuelles 2007,**38**,543-547.

43. FREUNDT E.A.

culture for classic mycoplasmas In : RAZIN S., TULLY J.G.Methods in Mycoplasmology, vol.1, Mycoplasma characterization Academic Press New York, 1986,**305**, 137-146

44. GARLAND S., MURTON L.J.

Neonatal meningitis caused by *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Infect Dis*1987, **6**: 868-869.

45. GAUDIN OG.

Infection humaines à mycoplasme Encyclol.Med.Chirur.(Paris-France), Maladies infectieuses 1989, 8039V¹⁰, **9**, 1-6.

46. GRATTARD F., SOLEIHAC B., DE BARBEYRAC B., BEBEAR C., SEFFERT P.POZETTO B.

Epidemiologic and molecular investigations of genital mycoplasmas from women and neonates at delivery. *Pediatr Infect Dis* 1995, **J14**:853-858.

47. HAMMERSCHLAG M.R., ALPERT S., ROSNER I.

Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms - *Pediatrics* 1978, **62**: 57-62.

48. HENRY S.J.
Infections en gynécologie : les moyens actuels de diagnostic et de traitement Actualités gynécologiques, 1991, **22**, 101-112.
49. HERRERO H., COEVAS C., LIMIA A., DELGADO T., ALVAREZ J., LOPEZ B.M.,
Antimicrobial susceptibility of *U. urealyticum* from clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection* may 1997, **3**(2):277.
50. HOLMBERG S.D., STEWART J.A., GERBER A.L., BYERS R.H...
Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection *JAMA*, 1988, **259**, 1048-1050.
51. IZRAELI S., SAMRA Z., SIROTA L., MERLOB P., DAVIDSON S.
Genital mycoplasmas in preterm infants : prevalence and clinical significance. *Eur J Pediatr* 1991, **150**: 804-807.
52. JALIL N., DOBLE A., GILCHRIST C.
Infection of the epididymis by *Ureaplasma urealyticum*. *Genitourin Med* 1988, **64**: 367-368.
53. JANSEN E., HAKKARAINEN K...
Mycoplasmas and leukemia *Virology*, 1991, **142**, 333.
54. KENNY G.E.
Mycoplasmas *Manual of clinical microbiology* 1990,, 5th Ed, 478-482.
55. KLIENEBERGER E.
The natural occurrence of pleuro-pneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria *J. Pathol. Bacteriol.*, 1985, **40**, 93-105.
56. KRAUSE R., SCHUBERT S., ULLMAN U.
Mycoplasmas/Ureaplasmas: Increase in Resistance to Tetracyclines, Macrolides and Quinolones from 1983 to 1998. *Clinical Microbiology and Infection* March 1999, **5**(3):313.
57. LAMEY J.R., ESENBACH D.A., MITCHELL S.H., J.M., FOY H.M., KENNY G.E.
Isolation of mycoplasmas and bacteria from the blood of postpartum women. *Am J Obstet Gynecol* 1982, **143**: 104-112.

58. LATRILLE J.
Les mycoplasmes Bacteriologie Medicale Leon-Le-Minor. Ed Flammarion Médecine sciences
Paris, 1982, 758-766.
59. LO S.C., HAYES M.M., TULLY J.G.
Mycoplasma penetrans, sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *Int J Syst Bacteriol* 1992, **42**: 357-364.
60. LO S.C., TSAI S., BENISH J.R, SHIH J.W.K., WEAR D.J., WONG D.M
Enhancement of HIV-1 cytokinal effect in CD4+ Lymphocyte by the AIDS associated mycoplasma Sciences, 1991, **251**, 1074-1076.
61. LO S.C., WEAR D.J., GREEN S.L., JONES P.G., LEGIER J.F.
Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasmas fermentans* *Clin Infect Dis* 1993, **17 (Suppl 1)**: S259-263.
62. MAC CORMACK W.M., ALMEIDA P.C., BAILEY P.E., GRADY E.M., LEE Y.-H.
Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. *JAMA* 1972, **221**: 1375-1377.
63. MAC CORMACK W.M., LEE Y.-H., ZINNER S.H.
Sexual experience and urethral colonization with genital mycoplasmas: a study in normal men. *Ann Intern Med* 1973, **78**: 696-698.
64. MACONDO E A.
Mise au point et methods d'identification des Mycoplasmes. DEA de chimie et de biochimie, Dakar 1995.
65. MARDH P.A., NILSON F.J., BJELLE A.
Mycoplasmas and bacteria in synovial fluid from patients with arthritis. *Ann Rheum Dis* 1973 **32**: 319-325.
66. MARMONIER A. A.
Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques Dans Carbonelle B. et Coll Bactériologie médicale Techniques usuelles Paris, SIMEP, 1987, 227 – 237.
67. MOLLER B.R., TAYLOR-ROBINSON D., FURR P.M.
Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. *Lancet* 1984, **1**: 1102-1103.

68. MONTAGNIER L., BERNMAN D., GUETARD D, BLANCHARD A...
Inhibition de l'infectiosité de souches prototypes du VIH par des anticorps dirigés contre une séquence peptidique de mycoplasmes Académie, Sciences (Paris), 1990,**311**, 425-430.
69. NAESSENS A.
Les infections à *Ureaplasma urealyticum*. *Acta Urol Belg*1993, **61**: 153-156.
70. NDOUR M.A.NG.
Les mycoplasmes dans les infections urogénitales de la femme à Dakar (Résultats préliminaires) pharmacie: Dakar, 1988, N° **57**.
71. NOWACKS J.
Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripneumonie des Bovidés Ann. Inst. Pasteur, 1929, **43**, 1330-1352.
72. PAPIEROK G., PAUTRAT G., ESCARGUEL C.
Les Mycoplasmes : leur place en microbiologie *Revue française des labo.* 1992, n°**244** .
73. PATTERSON A.M., TACIAK V., LOVCHIK J., FOX R.E., CAMPBELL A.B., VISTARDI R.M.
Ureaplasma urealyticum respiratory tract colonization is associated with an increase in interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha relative to interleukin 6 in tracheal aspirates of preterm infants. *Pediatr Infect Dis* 1998, **J 17** : 321-328.
74. PERZIGIAN R.W., *et al.*
Ureaplasma urealyticum and chronic lung disease in very low birth weight infants during the exogenous surfactant era. *Pediatr Infect Dis*1998, **J 17** : 620-625.
75. PEREYRE S.,GONZALEZ P.,de BARBEYRAC B.,DARNIGE A.,RENAUDIN H., CHARRON A.,RAHERISON S.,BEBEARC.,and BEBEAR C.M.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, ASM Oct 2002,vol **46** n° 10, p.3142-3150.
76. PLATT R., LIN J.-S.L., WARREN J.W., ROSNER B., EDELIN K.C., MC CORMACK W.M.
Infection with *Mycoplasma hominis* in postpartum fever. *Lancet*1980, **2**: 1217-1221.
77. PILET C., BOURDON J L., TOMA B., MARCHAL N.....
Famille des mycoplasmataceae Bactériologie Médicale et vétérinaire, 1987, 353-359.
78. RAPHENON G.
Mécanisme de résistance des bactéries aux antibiotiques *Forum Médical* 1996,**9** :6-11.

79. REMIC Par le groupe Remic de la Société Française de Microbiologie 2004, Chp 21 p. 48.
80. RENAUDIN H., QUENTIN C., de BARBEYRAC B., BEBEAR C
In vitro activity of new quinolones against Mycoplasma pathogenic to human. Pathologie-biologie 06/1988, **36**(5) 496-9.
81. ROSE B.I., SCOTT D.B.
Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. *Fertil Steril* 1994, **61** (2): 341-348.
82. SAMRA ZMIRA., ROSENBERG SHOSHANA., SOFTER YIGAL.
In vitro susceptibility of *Mycoplasma hominis* clinical isolates to Tetracyclines, Quinolones and Macrolides. Diagnostic Microbiology and infection disease 2003, **44**(4):354-361.
83. SANCHEZ P.J.
Perinatal transmission of *Ureaplasma urealyticum*: current concepts based on review of the literature. *Clin Infect Dis* 1993, **17** (Suppl 1): S107-111.
84. SARLANGUE J., BEBEAR C.
Medecine thérapeutique/pédiatrique, mars-avril 1999, vol 2, N° 2, 105-109.
85. SENJI P., ZELE S., KALENIC S.
Susceptibility of *U.urealyticum* to antibiotics. Clinical Microbiology and infection may 1997 **3**(3):277
86. SIBOULET A., BOHBOT J.M.
Infections urogénitales à mycoplasmes T: traitement et rôle dans la stérilité
Bull.Mem.Soc.Med., Paris, 1980, **6**, 176-1.
87. SHEPARD M.C.
Culture media for Ureaplasmas In : RAZIN S., TULLY J.G. Methods in mycoplasmaology, vol.1, Mycoplasma characterization Academic Press New York, 1986, **305**, 137-146.
88. SHEPARD M.C.
Recovery of PPLO from negro men with and without non gonococcal urethritis
Am.J.Syph.Gonoc.Vener.Dis., 1954, **38**, 113-124.
89. SOPHIE FOURMAUX., CHRISTIANE BEBEAR.
Infection urogénitales liées aux Chlamydia et aux mycoplasmes. Progrès en urologie 1997 **7**, 132-136.

90. SOW A I.,DIALLO Y.,DIAB EL HADI A and SAMB A.
In vitro sensitivity to antibiotics in 178 stains of genitals mycoplasma isolated from gynecology consultant in Dakar.Bulletin de la Société de Pathologie exotique 2000,**93**(1):6-7.
91. TAYLOR-ROBINSON D.
Genital mycoplasma infections.*Clin Lab Med* 1989,**9**: 501-523.
92. TAYLOR D., ROBINSON.
Infections due to species of Mycoplasma and ureaplasma : an update Clinical infectious diseases, 1996,**23**, 671-684.
93. TAYLOR-ROBINSON D., GILROY C.B., HAY P.E.
Occurrence of Mycoplasma genitalium in different populations and its clinical significance. *Clin Infect Dis*1993, **17 (Suppl 1)**: S66-68.
94. TULLY J.G. - Current status of the mollicute flora of humans. *Clin Infect Dis*1993,**17(Suppl 1)**: S2-9.
95. TULLY J.G., TAYLOR-ROBINSON D., ROSE D.L., FURR P.M., HAWKINS D.A.
Evaluation of culture media for the recovery of Mycoplasma hominis from the human orogenital tract. *Sex Transm Dis*1983,**10 (Suppl)**: 256-260.
96. TULLY J.G., TAYLOR-ROBINSON D., COLE R.M., ROSED.L.
A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet*1981, **1**: 1288-1291.
97. VAN WAARDE W.M., BRUS F., OKKEN A., KIMPEN J.L.
Ureaplasma urealyticum colonization, prematurity and bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 1997, **J 10**: 886-890.
98. VANWAYENBERGH J.
L'urétrite masculine. *Acta Urol Belg*1993 , **61**: 157-160.
99. WAITES K.B., CROUSE D.T., NELSON K.G., RUDD P.T.,CANUPP K.C., RAMSEY C., CASSEL G.H.
Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection of central nervous system in preterm infants.*Lancet*1988, **2(9)**: 17-21.
100. WAITES K.B., DUFFY L.B., CROUSE D.T.
Mycoplasmal infection of cerebrospinal fluid in newborn infants from a community hospital population. *Pediatr Infect Dis* 1990, **J 9**:241-245.
101. WANG E.E., CASSELL G.H., SANCHEZ P.J., REGAN A., PAYNE N.R., LIU P.P.
Ureaplasma urealyticum and chronic lung disease of prematurity: critical appraisal of literature on causation. *Clin Infect Dis*1993, **17 (suppl. 1)**: S112-S116.

102. WEIDNER W., KRAUSE W., SCHEIEFFER H.G., BRUNNER H., FRIEDRICH H.J. Ureaplasma infection of the male urogenital tract in particular prostatitis and semen quality Urol.Ins., 1985,**40**, 5-9.

103. WIENTZEN R.L.

Genital *Mycoplasma* and the pediatrician. *Pediatr Infect Dis*1990, **J 9**: 232-235.