

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	4
1. IDENTIFICATION DES MYCOPLASMES	5
1.1 CLASSIFICATION	5
1.2 CARACTERES GENERAUX DES MYCOPLASMES	8
1.2.1 <i>CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET STRUCTURAUX</i>	8
1.2.2 <i>CARACTERES BIOCHIMIQUES</i>	9
1.2.3 <i>CARACTERES CULTURAUX</i>	10
1.3 IDENTIFICATION DE L'ESPECE	11
1.4 FACTEURS DE VIRULENCE	11
2. EPIDEMIOLOGIE.....	13
2.1 CHEZ LE NOUVEAU-NE.....	13
2.2 CHEZ L'ADOLESCENT A LA PUBERTE.....	13
2.3 CHEZ L'ADULTE	13
2.3.1 <i>LOCALISATION</i>	13
2.3.2 <i>FREQUENCE D'ISOLEMENT</i>	14
2.3.3 <i>FACTEURS FAVORISANTS</i>	14
3. GENETIQUE	15
4. POUVOIR PATHOGENE	16
4.1 MYCOPLASMES ET INFECTIONS DU TRACTUS GENITAL CHEZ L'HOMME	16
4.1.1 <i>URETRITES NON GONOCOCCIQUES</i>	16
4.1.2 <i>PROSTATITES AIGUËS ET CHRONIQUES</i>	17
4.1.3 <i>EPIDIDYMITES</i>	18
4.2 MYCOPLASMES ET INFECTIONS GYNECOLOGIQUES	18
4.2.1 <i>VAGINITES ET CERVICITES</i>	18
4.2.2 <i>ENDOMETRITES, SALPINGITES, INFLAMMATIONS PELVIENNES</i>	18
4.3 MYCOPLASMES ET TROUBLES DE LA REPRODUCTION.....	19
4.3.1 <i>STERILITE</i>	19
4.3.2 <i>PATHOLOGIES AU COURS DE LA GROSSESSE</i>	19
4.4 ATTEINTES NEONATALES.....	20
4.5 MYCOPLASMES ET S.I.D.A : LA NOTION DE COFACTEUR	20
4.6 MYCOPLASMES ET CANCER	21
5. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	22
5.1 RESISTANCE NATURELLE.....	22
5.2 RESISTANCE ACQUISE	22
5.2.1 <i>RESISTANCE AUX CYCLINES</i>	23
5.2.1.1 Mécanisme d'action des cyclines.....	23
5.2.1.2 Mécanisme de résistance	23
5.2.2 <i>RESISTANCE AUX MACROLIDES</i>	23
5.2.2.1 Mécanisme d'action des MLS	23
5.2.2.2 Mécanisme de résistance	23
5.2.3 <i>RESISTANCE AUX QUINOLONES</i>	24
5.2.3.1 Mécanisme d'action des quinolones	24
5.2.3.2 Mécanisme de résistance	24
5.2.4 <i>RESISTANCE AUX AUTRES ANTIBIOTIQUES</i>	24
6. LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE	25
6.1 DEFINITION D'UN ANTIBIOTIQUE	25
6.2 DETERMINATION DE LA CMI D'UN ANTIBIOTIQUE.....	25
6.3 E-TEST (EPSILLOMETER-TEST)	27
6.4 MICROMETHODES D'ETUDE « IN VITRO » DE LA SENSIBILITE DES GERMES AUX	
ANTIBIOTIQUES	28
6.4.1 <i>METHODE UTILISANT DEUX CONCENTRATIONS CRITIQUES</i>	28
6.4.2 <i>METHODES UTILISANT UNE CONCENTRATION CRITIQUE</i>	29

6.4.3	SYSTEME EFFECTUANT UNE ANALYSE CINETIQUE DE LA CROISSANCE	29
6.4.4	DILUTION EN BOUILLON	30
6.4.5	AVANTAGES ET INCONVENIENTS	30
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL		31
CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES		32
1.	MATERIELS ET REACTIFS [23, 50].....	33
1.1	SOUCHES BACTERIENNES	33
1.2	MATERIELS POUR LA PREPARATION DES MILIEUX	33
1.3	MATERIELS POUR L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION	33
1.4	MATERIELS POUR LA PREPARATION DES ANTIBIOTIQUES	34
1.5	REACTIFS.....	34
2.	METHODOLOGIE	35
2.1	PRINCIPE	35
2.2	PREPARATION DES MILIEUX D'ISOLEMENT D'IDENTIFICATION DE LA METHODE CSB	35
2.2.1	MILIEU DE TRANSPORT ET DE CONSERVATION.....	35
2.2.2	MILIEUX D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION.....	36
2.2.3	IDENTIFICATION ET TITRAGE.....	38
2.3	PREPARATION DES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES.....	41
2.3.1	SOLUTIONS DE STOCK.....	41
2.3.2	CONCENRATION CRITIQUE SUPERIEUR (C.C.S.).....	41
2.3.3	CONCENRATION CRITIQUE INFERIEUR (C.C.I.)	41
2.4	DESHYDRATION DES PLAQUES	43
2.5	L'ANTIBIOGRAMME	43
2.5.1	PREPARATION DE L'INOCULUM	43
2.5.2	INOCULATION DE LA PLAQUE.....	44
2.5.3	LECTURE ET INTERPRETATION.....	44
2.5.4	PRECAUTIONS D'EMPLOI.....	44
2.6	CONTROLE DE QUALITE	45
CHAPITRE 2 : RESULTATS ET COMMENTAIRES.....		46
2.1	POPULATION D'ETUDE	47
2.2	LES SOUCHES IDENTIFIEES.....	48
2.3	TITRAGE	48
2.4	SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	48
2.4.1	SENSIBILITE AUX CYCLINES.....	49
2.4.2	SENSIBILITE AUX MACROLIDES	50
2.4.3	SENSIBILITE AUX QUINOLONES.....	50
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....		57
3.1	ORIGINE DE SOUCHES	58
3.2	REPARTITION DES SOUCHES	59
3.3	CSB SYSTEME MYCOPLASMES.....	59
3.4	SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	60
3.4.1	LES CYCLINES.....	60
3.4.1.1	Sensibilité de <i>Ureaplasma urealyticum</i> aux cyclines	60
3.4.1.2	Sensibilité de <i>Mycoplasma hominis</i> aux cyclines	61
3.4.2	LES QUINOLONES	62
3.4.3	LES MACROLIDES.....	65
CONCLUSION.....		67
BIBLIOGRAPHIE.....		71



Les mycoplasmes sont présents à l'état commensal dans la sphère urogénitale.

Leur isolement doit être interprété avec prudence en fonction du site anatomique, de leur quantité et de leurs éléments cliniques.

Ureaplasma urealyticum serait responsable de 15 % d'urétrites non gonococciques chez l'homme [4, 6, 20, 64], d'arthrites septiques et jouerait aussi un rôle dans les stérilités masculines en altérant la mobilité des spermatozoïdes [4]. Il est aussi mis en cause dans les avortements spontanés à répétition dans 28 % des cas, dans les chorio-amniotites et dans la prématurité.

Mycoplasma hominis agirait en symbiose avec d'autres micro-organismes comme *Gardnerella vaginalis* et certaines anaérobies dans la genèse des vaginites non spécifiques. Il est responsable d'abcès pelviens, de salpingites et d'endométrites [4] et joue un rôle certain dans les fièvres du post-partum et du post-abortionum.

Certains auteurs pensent à une intervention des mycoplasmes dans la genèse de cancers du col [40] et la pénétration du VIH dans la cellule sensible [18, 45].

Il existe actuellement une série d'antibiotiques utilisée pour traiter ces infections à mycoplasme parmi lesquels : les Tétracyclines, les Macrolides et les Quinolones.

Les mycoplasmes sont des êtres vivants doués de propriétés diverses parmi lesquelles la capacité d'élaborer des stratégies à même de s'opposer à l'action des antibactériens.

En raison de l'émergence de résistance des mycoplasmes urogénitaux aux antibiotiques, plus particulièrement *Ureaplasma urealyticum* aux cyclines (10 %) ainsi qu'à l'érythromycine (10-40 %), l'utilisation des antibiotiques en clinique humaine devrait donc nécessairement passer par l'étude in vitro de la sensibilité, afin d'aider les cliniciens dans le choix d'une antibiothérapie de première intention adaptée aux données épidémiologiques locales.

En effet, la prescription d'antibiotiques presque exclusivement probabiliste en médecine de ville devrait se baser sur les fréquences d'isolement des bactéries dans la pathologie concernée et sur le profil antibiotique dans l'environnement considéré.

Ce travail avait pour objectif l'étude de la sensibilité des mycoplasmes aux antibiotiques.

PREMIERE PARTIE



GENERALITES

1. IDENTIFICATION DES MYCOPLASMES

1.1 CLASSIFICATION

Le génome des mycoplasmes est typiquement procaryotique et sa taille la plus petite actuellement connue permettant une réplication [6, 41, 53, 54, 65]. Le terme mycoplasme est utilisé pour l'ensemble de la classe des mollicutes. Cette classe comporte quatre ordres (*Tableau 1*) :

- les Mycoplasmatales ;
- les Entomoplasmatales ;
- les Acholeplasmatales ;
- les Anaeroplasmatales.
- 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 :
 - Le genre *Mycoplasma* est constitué de 100 espèces dont 13 espèces humaines (*Tableau 2*).
 - 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 1 : Classification des mycoplasmes [64]

CLASSIFICATION		HABITAT
ORDRE 1	Mycoplasmatales	
Famille 1	<i>Mycoplasmataceae</i>	
<i>Genre 1</i>	Mycoplasma	Hommes, animaux, plantes, insectes
<i>Genre 2</i>	Ureaplasma	Hommes, animaux
ORDRE 2	Entomoplasmatales	
Famille 1	<i>Entomoplasmataceae</i>	
<i>Genre 1</i>	Entomoplasma	Plantes, insectes
<i>Genre 2</i>	Mesoplasma	Plantes, insectes
Famille 2	<i>Spiroplasmataceae</i>	
<i>Genre 1</i>	Spiroplasma	Arthropodes (insectes inclus), plantes
ORDRE 3	Acholeplasmatales	
Famille 1	<i>Acholeplasmataceae</i>	
<i>Genre 1</i>	Acholeplasma	Animaux, plantes, insectes
ORDRE 4	Anaeroplasmatales	
Famille 1	<i>Anaeroplasmataceae</i>	
<i>Genre 1</i>	Anaeroplasma	Ruminants
<i>Genre 2</i>	Asteroplasma	Ruminants

Tableau 2 : Les différentes espèces humaines de Mycoplasma [53, 64]

Espèces	Localisation principale	Pouvoir pathogène	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 primatum</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

- Non pathogène

± Probable

+ Certain

1.2 CARACTERES GENERAUX DES MYCOPLASMES

1.2.1 CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET STRUCTURAUX

Les mycoplasmes sont des cellules simples, ils ont la forme d'un coccus.

Ils sont difficiles à observer au microscope optique même en contraste de phase, c'est au microscope électronique que leur morphologie a été étudiée.

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

Ils sont dépourvus de paroi, ce qui 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 β -lactamines.
- Une grande plasticité.

Les mycoplasmes sont entourés d'une membrane plasmique à trois feuilletts. Cette membrane est constituée de lipides, de protéines, de 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 [6, 51, 54].

1.2.2 CARACTERES BIOCHIMIQUES

Les mycoplasmes fermentent le glucose, hydrolysent l'urée et l'arginine.

Ces trois propriétés sont utilisées dans le diagnostic biologique et permettent de les différencier [22, 51, 53].

Il existe d'autres caractères comme la réduction du chlorure de 2,5,5-triphényl tétrazolium, l'hémadsorption et l'activité phosphatasique, mais ces propriétés sont beaucoup moins intéressantes (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Profil métabolique des mycoplasmes [53, 64]

ESPECES	CARACTERES BIOCHIMIQUES		
	GLUCOSE	ARGININE	UREE
<i>Mycoplasma buccale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma faucium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma pirum</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma primatum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma orale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma salivarium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	-	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	+

1.2.3 CARACTERES 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 la solidité vis à vis de l'environnement.

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

Le milieu de base est constitué de macération 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** [19] et des milieux SP₄ [30]. 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 à 3 jours (alcalinisation du milieu par dégradation de l'arginine).

Sur milieu gélosé, après incubation sous atmosphère anaérobie ou sous CO₂, les mycoplasmes 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 Ureaplasmes dérivent du milieu de **Shepard** [62] et contiennent du chlorure de manganèse qui donnent 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 1-3 jours à 37°C en anaérobiose. En revanche, la détection en milieu liquide s'effectue plus rapidement par l'activité uréasique puissante des Uréaplasmes (18 heures pour obtenir une alcalinisation du milieu).

1.3 IDENTIFICATION DE L'ESPECE

Cette identification repose sur deux critères essentiels :

- l'aspect des colonies en milieu solide ;
- les caractères biochimiques.

Le diagnostic rapide est possible grâce à la détection du génome par PCR ou par hybridation moléculaire. Ces techniques ont une sensibilité et une spécificité supérieure à celle de la culture en milieu liquide.

Des tests sérologiques de mycoplasmes urogénitaux ont été proposés pour la recherche d'anticorps spécifiques, mais la présence de plusieurs sérotypes (7 pour *Mycoplasma hominis* et 14 pour *Ureaplasma urealyticum*) complique leur réalisation et certains ne sont utilisables chez des sujets traités par des antibiotiques inhibiteurs métaboliques.

Etant donné le caractère peu immunogène, la sérologie ne permet d'effectuer qu'un diagnostic différentiel entre une infection profonde (salpingite, endométrite, prostatite, septicémie du post-abortum et du post-partum...) et une infection basse à mycoplasme.

Les trois techniques les plus connues sont : l'inhibition métabolique, l'ELISA et l'immunofluorescence [17, 27, 41, 42, 57].

1.4 FACTEURS DE VIRULENCE

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 [4, 51, 59] :

- **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 chargés 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 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

- Les produits terminaux du métabolisme cellulaire
 - L'eau oxygénée, produit terminal de la respiration des mycoplasmes et 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 Ig.A ou de l'interféron.

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

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

- Les toxines

2. EPIDEMIOLOGIE

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

2.1 CHEZ LE NOUVEAU-NE

Les mycoplasmes urogénitaux peuvent être retrouvés au niveau de la gorge, du naso-pharynx et des organes génitaux.

Les germes sont isolés des voies génito-urinaires de 10-20 % des fillettes et de 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* (ce dernier à moindre importance). Ce saprophytisme disparaît avec l'âge, et leur isolement est exceptionnel chez l'enfant avant la puberté.

2.2 CHEZ L'ADOLESCENT A LA PUBERTE

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.

2.3 CHEZ L'ADULTE

2.3.1 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.

2.3.2 FREQUENCE 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 de MST [28, 44].

2.3.3 FACTEURS FAVORISANTS

❖ L'activité sexuelle

Une étude réalisée par **Taylor et Robinson** [64] rapporte la fréquence des mycoplasmes en fonction du nombre de partenaires sexuels des individus.

Tableau 4 : Fréquence des mycoplasmes en fonction du nombre de partenaires sexuels [38, 51]

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 [6, 34] avaient aussi montré que la colonisation des muqueuses génitales par les mycoplasmes augmentait avec l'activité sexuelle. **Bebear et Latrille** [6] ont mis ceci en évidence chez des prostituées [34].

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) [51].

❖ 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.

3. GENETIQUE

Le génome des mycoplasmes est un ADN circulaire à double brin.

Par sa taille ($5 \cdot 10^8$ - 10^9), il est le plus petit des génomes de cellules procaryotes. La composition en paire de base de l'ADN est de 23-41 moles de G + C % pour Mycoplasma et 27-30 moles de G + C % pour Ureaplasma.

Les techniques d'hybridation moléculaire de l'ADN ont montré qu'il n'existe pas d'homologie entre les différentes espèces de mycoplasmes.

Des échanges génétiques ont mis en évidence : transformation, conjugaison et transduction [6].

4. 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 [41, 64].

Néanmoins *Ureaplasma urealyticum* est présenté comme l'agent d'urétrites non gonococciques 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 [51].

Dans une étude, **Coprin et Lebrun** [20] ont présenté les implications de mycoplasmes uro-génitaux dans différents types d'infections.

4.1 MYCOPLASMES ET INFECTIONS DU TRACTUS GENITAL CHEZ L'HOMME

Ureaplasma urealyticum est l'espèce la plus souvent en cause dans les infections masculines. Le rôle de *Mycoplasma hominis* est beaucoup plus aléatoire et celui de *Myoplasma genitalium* encore très mal précisé. Différents tableaux cliniques peuvent être concernés. La responsabilité d'*Ureaplasma urealyticum* varie selon le site. Si son pouvoir pathogène est certain dans les Urétrites Non Gonococciques (U.N.G), il fait encore l'objet de controverses dans d'autres atteintes telles que prostatites [17].

4.1.1 URETRITES NON GONOCOCCIQUES

Ureaplasma urealyticum est à côté de *Chlamydia trachomatis*, un des agents causals 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) et la sécrétion urébrale importante. Il a été même décrit des formes hémorragiques douloureuses.

- L'urétrite subaiguë est la plus fréquente : la période d'incubation est de 10-60 jours et les urines sont claires. A l'urétroscopie, on a une muqueuse rougeâtre enflammée avec quelque fois des formes traînantes et un œdème du col vésical.

Différentes hypothèses ont été évoquées par **Taylor et Robinson** [64] pour expliquer cet organisme puisse passer de l'état commensal à l'état pathogène, seuls certains sérotypes pourraient l'être. Ils produiraient une urétrite et pourraient ensuite persister dans les glandes para-urétrales, dans la prostate...

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. Quant à *Mycoplasma genitalium*, il a été isolé initialement à partir d'UNG, il possède des propriétés d'adhésion qui en font un pathogène potentiel et des anticorps ont pu être mis en évidence chez certains individus.

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

4.1.2 PROSTATITES AIGUËS ET CHRONIQUES

D'autres auteurs [53] ont utilisé des techniques de fractionnement des prélèvements. Ils ont pour cela quantifié les uréaplasmes dans les urines du premier jet, les urines vésicales, les sécrétions prostatiques ainsi que dans le sperme. Leur résultat indique que *Ureaplasma urealyticum* peut coloniser la prostate, il ne paraît cependant pas intervenir dans les prostatites aiguës. Il jouerait un rôle d'entretien dans les prostatites chroniques dans environ 15 % des cas.

4.1.3 EPIDIDYMITES

Le rôle d'*Ureaplasma urealyticum* est ici controversé. Les épидидymites peuvent être dues à *Chlamydia trachomatis* ou à des bactéries pathogènes du tractus urinaire. Des études [38] suggèrent qu'elles peuvent intervenir mais probablement de façon ponctuelle.

4.2 MYCOPLASMES ET INFECTIONS GYNECOLOGIQUES

4.2.1 VAGINITES ET CERVICITES

Mycoplasma hominis est fréquemment isolé à partir de vaginites non spécifiques. Il intervient probablement en association avec d'autres agents pathogènes tels que *Gardnerella vaginalis* et anaérobies. Il jouerait un rôle en symbiose avec les autres pathogènes, l'élévation du pH résultant de l'infection favorise sa multiplication. Les mycoplasmes ne semblent pas jouer un rôle important dans la survenue de cervicites.

4.2.2 ENDOMETRITES, SALPINGITES, INFLAMMATIONS PELVIENNES

Mycoplasma hominis a été isolé à d'assez nombreuses reprises par hémoculture lors de poussées fébriles post-partum ou post-abortum. Il provoquerait 5-10 % de ces poussées après accouchement, généralement modérées par l'intermédiaire d'une endométrite.

Des études sérologiques [18, 27] ont montré que *Mycoplasma hominis* pourrait être associé à des salpingites.

4.3 MYCOPLASMES ET TROUBLES DE LA REPRODUCTION

4.3.1 STERILITE

C'est l'un des domaines où le rôle des mycoplasmes est le plus controversé. *Ureaplasma urealyticum* a été impliqué dans la survenue de stérilités masculines. L'observation de biopsie testiculaire a suggéré que les uréaplasmes pouvaient interférer avec la spermatogenèse : altération du nombre des spermatozoïdes et de leur mobilité, présence de formes aberrantes. L'adhérence in vitro d'*Ureaplasma urealyticum* aux spermatozoïdes semble confirmer ce rôle [6]. Cependant, les enquêtes publiées ne sont pas concordantes.

4.3.2 PATHOLOGIES AU COURS DE LA GROSSESSE

Au cours de la grossesse, *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* peuvent coloniser l'endomètre, les membranes fœtales, le liquide amniotique et les tissus fœtaux comme ont pu le montrer des cultures des tissus prélevés par césarienne ou amniocentèse.

Les mycoplasmes spécialement *Ureaplasma urealyticum*, ont été mis en cause dans des tableaux cliniques variés : avortement spontané à répétition, prématurité et chorio-amniotites. C'est ainsi que *Ureaplasma urealyticum* a été isolé plus fréquemment à partir de prélèvements d'endomètres chez des patientes présentant des avortements (28 %) que sur un groupe témoin (7 %). Des enquêtes épidémiologiques suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle important que la plupart des autres espèces bactériennes. *Ureaplasma urealyticum* a pu être isolé chez des enfants nés de patientes présentant une chorioamniotite sévère. Il semblerait bien avoir une association chorioamniotite et uréaplasmes.

4.4 ATTEINTES NEONATALES

L'hypotrophie néonatale et les infections respiratoires ou méningées chez les nouveau-nés hypotrophiques sont les deux catégories de tableaux cliniques envisagées.

Des études statistiques ont montré que les nouveau-nés colonisés par *Ureaplasma urealyticum* au niveau de leurs voies aériennes avaient un poids moyen de naissance plus faible (2 605 g) que ceux non colonisés (2 952 g). Une autre étude a montré que 28 % des enfants hypotrophiques ($\leq 2\ 500$ g) étaient colonisés par *Ureaplasma urealyticum* contre 5 % pour ceux pesant plus de 2 500 g. Cette relation n'a pas été retrouvée pour *Mycoplasma hominis*. Récemment *Ureaplasma urealyticum* a été trouvé responsable d'infections respiratoires chez des nouveau-nés à risque. L'étude bactériologique d'aspirations endotrachéales chez des nouveau-nés hypotrophiques présentant des infections respiratoires a montré que *Ureaplasma urealyticum* était le plus souvent en cause. Il s'agissait d'une infection acquise in utero puisque dans un nombre important des cas, les enfants étaient nés par césarienne [16].

4.5 MYCOPLASMES ET S.I.D.A : LA NOTION DE COFACTEUR

Les travaux des équipes de **Montagnier L. et de Lo S.C.** (USA) [45], 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 [36] conduisent maintenant à considérer deux hypothèses [18, 45, 49] :

- 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.

4.6 MYCOPLASMES ET CANCER

Janssen et coll. [40] ont démontré récemment 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. D'autres part, certains auteurs pensent à une intervention de divers agents bactériens comme les mycoplasmes dans la genèse des cancers du col.

5. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes génitaux devrait être pratiquée à chaque fois que l'on estime qu'ils sont responsables d'une infection. Certaines résistances naturelles sont très visibles, par contre d'autres sont en général variables [5, 10, 25, 28, 32, 47, 48, 51, 56].

5.1 RESISTANCE NATURELLE

Les mycoplasmes sont des bactéries sans paroi, par conséquent tous les antibiotiques dont le mécanisme d'action consiste à inhiber la biosynthèse des constituants de la paroi bactérienne sont à priori inactifs sur les mycoplasmes et sont à placer dans ce groupe :

- les β -lactamines ;
- la Bacitracine ;
- la Vancomycine ;
- la Phosphomycine.

5.2 RESISTANCE ACQUISE

Le choix d'un traitement face à une infection bactérienne est fonction de divers paramètres :

- la sensibilité du germe in vivo ;
- l'étiologie éventuelle mixte ;
- la localisation de l'infection ;
- l'état du malade et les éventuelles contre-indications à certaines molécules.

Les tétracyclines et les macrolides sont les antibiotiques les plus habituellement utilisés dans le traitement des infections à mycoplasmes.

Les CMI et les pourcentages de souches résistantes relevées dans la littérature sont extrêmement variables. La valeur absolue de la CMI doit être relativisée par l'essai en parallèle de souches de référence dans les conditions de

culture des mycoplasmes : l'influence de différents facteurs physico-chimiques sur l'activité in vitro des antibiotiques peut être évaluée.

5.2.1 RESISTANCE AUX CYCLINES

5.2.1.1 Mécanisme d'action des cyclines

Les tétracyclines se fixent au niveau du site A de la fraction 30 S et empêchent la liaison de l'aminoacyl-t-ARN. Elles bloquent ainsi la phase d'élongation de la synthèse protéique.

5.2.1.2 Mécanisme de résistance

Le mécanisme de résistance des mycoplasmes est dû aux gènes « tet M » qui code pour une résistance croisée à la tétracycline et à la doxycycline. Cette résistance est susceptible d'être à l'origine d'échecs thérapeutiques.

5.2.2 RESISTANCE AUX MACROLIDES

5.2.2.1 Mécanisme d'action des MLS

Ils inhibent la synthèse protéique au niveau du ribosome. Ils se fixent tous au niveau de la sous unité 50 S, mais le mécanisme est très mal connu.

Ils inhibent la translocation et la réaction de transpeptidation au site P. Ils favoriseraient la libération prématurée du complexe t-ARN-peptide du ribosome.

Ils agiraient à un stade plus précoce que les macrolides avant la formation des polysomes en inhibant la fixation de l'acetyl-t-ARN au site accepteur ainsi que la formation de la liaison peptidique.

5.2.2.2 Mécanisme de résistance

Le mécanisme impliqué est un phénomène d'efflux : c'est un transport vers l'extérieur par des cassettes transporteurs d'antibiotiques.

5.2.3 RESISTANCE AUX QUINOLONES

5.2.3.1 Mécanisme d'action des quinolones

Ils inhibent la synthèse de l'ADN par blocage de l'ADN-gyrase. L'activité de la sous unité A de cette enzyme est inhibée.

5.2.3.2 Mécanisme de résistance

Deux mécanismes sont impliqués dans la résistance aux quinolones chez les mycoplasmes :

- modification de l'ADN-gyrase ;
- altération des sous-unités de la topoisomérase IV.

5.2.4 RESISTANCE AUX AUTRES ANTIBIOTIQUES

D'autres résistances sont connues avec la rifamycine, les sulfamides et la triméthoprime. La 5-nitroimidazole et le nitrofurane sont peu actifs ou totalement inactifs sur les mycoplasmes génitaux.

6. LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE

[10, 13, 24, 25, 39, 46, 47, 55]

6.1 DEFINITION D'UN ANTIBIOTIQUE

Un antibiotique est :

- généralement synthétisé par un micro-organisme, mais souvent modifié chimiquement ou même synthétisé entièrement par les chimistes ;
- une molécule toxique pour un groupe cible de micro-organisme mais peu toxique pour les cellules eucaryotes supérieures, donc utilisables par voie générale ;
- de mode d'action spécifique et actif à des concentrations faibles de l'ordre du $\mu\text{g cm}^{-3}$.

6.2 DETERMINATION DE LA CMI D'UN ANTIBIOTIQUE

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 d'antibiotique.

- Pour les faibles concentrations, on a un ralentissement de la croissance bactérienne mais à tout moment le nombre de bactéries est supérieur ou égal au nombre initial de bactéries, l'antibiotique a un effet dit bactériostatique.

Cet effet résulte soit d'un ralentissement du temps de division bactérienne, soit d'un équilibre entre la croissance normale et la destruction des bactéries.

- Pour les fortes concentrations, on constate une réduction du nombre de micro-organismes au cours du temps : l'antibiotique exerce un effet bactéricide.

Définition de la CMI :

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18-24 heures la multiplication des bactéries. 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 lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte in vivo sans utiliser des doses 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 est dite « intermédiaire » : les micro-organismes ne pourront pas être atteints avec une antibiothérapie « standard », mais ils pourront l'être soit :

- par un traitement administré par voie générale à fortes doses (ceci n'est possible qu'avec des produits non et peu toxiques) ;
- si la concentration de l'antibiotique est assez élevée au siège de l'infection.

La détermination de la CMI sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution (en milieu solide ou en milieu liquide), par diffusion (méthode des disques) ou par élution. Le principe général est basé sur une distribution en série sous un même volume des concentrations décroissantes d'antibiotiques, en présence d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries/ml.

6.3 E-test (EPSILLOMETER-TEST)

Le E-test est une technique de détermination de la CMI basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone continue de 0,016 à 256 mg/l ou 0,002 à 32 mg/l en fonction des molécules.

Le E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes de 5 mm de large et 50 mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec la bandelette définit la CMI.

Cette nouvelle méthode de mesure de la CMI présente les avantages des méthodes de diffusion : simplicité, rapidité, large choix des molécules à tester [33].

Cependant la mise en place des bandelettes et l'interprétation sont délicates. La croissance trop lente des mycoplasmes ne permet pas d'utiliser cette technique de même que celle des disques en milieu gélosé.

Il faut procéder à une étude de l'activité des antibiotiques par la méthode des dilutions en milieu liquide qui permet de définir la CMI ou plus exactement la concentration minimale métabolique puisque la culture est jugée sur la variation du pH qu'entraîne l'hydrolyse de l'urée par *Ureaplasma urealyticum* ou de l'arginine par *Mycoplasma hominis*.

6.4 MICROMETHODES D'ETUDE « IN VITRO » DE LA SENSIBILITE DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES

Les appareils utilisés par cette méthode fonctionnent schématiquement selon deux principes :

- ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité ;
- ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou de plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'un indice propre à chaque machine.

Dans tous les cas, l'antibiogramme reste un test permettant de collecter en routine des données sur l'aptitude des bactéries à croître en présence d'antibiotiques dans des conditions précises de milieu, d'inoculum et de temps.

Le principal problème avec ces appareils est la détection ou la mesure d'une croissance.

6.4.1 METHODE UTILISANT DEUX CONCENTRATIONS CRITIQUES

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

- La concentration critique inférieure (CCI) correspond au taux sanguin moyen obtenu aux posologies habituelles.
- La concentration critique supérieure (CCS) correspond au taux sanguin maximal obtenu par l'administration de fortes doses. Certains systèmes utilisent ces concentrations critiques pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Ces méthodes sont à l'origine des premiers appareils automatiques. Avec ces méthodes, on peut interpréter directement les résultats de l'antibiogramme. En effet, lorsque la croissance est étudiée par mesure d'une activité enzymatique, on utilise les concentrations critiques supérieure et inférieure fixées par les Comités Nationaux d'Antibiogramme.

Le résultat obtenu est logique :

- la croissance en présence de la plus forte concentration d'antibiotiques est le fait de souches résistantes ;
- la croissance en présence de la plus faible concentration seulement est caractéristique des souches intermédiaires ;
- l'inhibition de la croissance aux deux concentrations d'antibiotiques est spécifique des souches sensibles.

La croissance est décelée par photométrie et / ou néphélométrie. La lecture se fait à l'œil nu pour certaines méthodes.

Il existe différents systèmes, les plus utilisés sont les systèmes ABAC et ATB-API.

Seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes. L'inoculum bactérien avoisine 10^5 – 10^6 bactéries/ml.

6.4.2 METHODES UTILISANT UNE CONCENTRATION CRITIQUE

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

L'inoculum bactérien est de 10^6 bactéries/ml.

6.4.3 SYSTEME EFFECTUANT UNE ANALYSE CINETIQUE DE LA CROISSANCE

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

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

6.4.4 DILUTION EN BOUILLON

Les méthodes de dilution en bouillon MH pour la détermination de la CMI peuvent être réalisées en plaque de micro titration. Cette micro méthode est plus adaptée à la pratique de l'antibiogramme grâce à une automatisation possible.

Les systèmes pour antibiogramme ont trouvé leur place dans les laboratoires de microbiologie. Leurs performances sont comparables à celle des technologies conventionnelles. Certains permettent aussi l'obtention rapide des résultats, ce qui assure aux biologistes un suivi plus fiable de leurs patients.

6.4.5 AVANTAGES ET INCONVENIENTS

a) Avantages

Ces micro méthodes d'étude de la sensibilité présentent plusieurs avantages. Les évaluations récentes des divers systèmes d'antibiogramme automatique montrent que la concordance avec la CMI (méthode de référence) existe dans plus de 85 % des cas. Ce pourcentage de concordance peut varier selon le système. Ces micro méthodes ont permis de réduire (en tout cas pour certains) les délais de réponse.

b) Inconvénients

Les micro méthodes présentent néanmoins des inconvénients :

- seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes ;
- aucun système actuellement disponible ne mérite au sens strict le qualificatif d'automatique, c'est-à-dire ne réalise de façon automatique l'ensemble des phases de la détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques ;
- le nombre d'antibiotiques testés par antibiogramme est limité par le nombre de cupules des plaques.

DEUXIEME PARTIE



TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE 1 :

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS ET REACTIFS [23, 50]

1.1 SOUCHES BACTERIENNES

Notre étude a porté sur 273 prélèvements génitaux ayant permis d'isoler 148 souches de mycoplasmes dont 108 *Ureaplasma urealyticum* et 42 *Mycoplasma hominis*.

Cette étude s'est déroulée du mois d'octobre 1998 au mois de mars 1999 à l'hôpital Aristide le Dantec.

1.2 MATERIELS POUR LA PREPARATION DES MILIEUX

- balance de précision ;
- agitateur magnétique ;
- pH-mètre ;
- flacons en verre avec bouchon à vis de 5, 100, 150 ml ;
- seringues ;
- filtres ;
- embouts stériles ;
- micro pipettes ;
- autoclave ;
- hotte à flux laminaire ;
- papier emballage.

1.3 MATERIELS POUR L' ISOLEMENT ET L' IDENTIFICATION

- micro plaques ;
- micro pipettes de 20 µl, 200 µl ;
- embouts stériles ;
- étuve ;
- films adhésifs ;
- bec bunsen.

1.4 MATÉRIELS 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 ;
- antibiotiques à tester.

1.5 REACTIFS

- bouillon A₃ ;
- bouillon urée ;
- bouillon arginine ;
- les antibiotiques utilisés appartiennent à différentes familles :
 - Les cyclines :
 - Tétracycline ;
 - Doxycycline.
 - Les macrolides :
 - Erythromycine ;
 - Lincomycine ;
 - Clarithromycine.
 - Les quinolones :
 - Ofloxacin ;
 - Péfloxacin ;
 - Ciprofloxacine.

2. METHODOLOGIE

2.1 PRINCIPE

Mycoplasma hominis et *Ureaplasma urealyticum* sont respectivement incubés dans le bouillon Arginine et dans le bouillon Urée en présence de deux concentrations critiques d'un antibiotique donné. La croissance est décelée et traduite grâce à un indicateur coloré, le rouge de phénol, qui passe du jaune au rouge après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C.

2.2 PREPARATION DES MILIEUX D'ISOLEMENT D'IDENTIFICATION DE LA METHODE CSB

Un bouillon A₃ : milieu de conservation et de transport des Mycoplasmes.

Un bouillon Arginine : milieu d'isolement et d'identification de *Mycoplasma hominis*.

Un bouillon Urée : milieu d'isolement et d'identification de *Ureaplasma urealyticum*.

Chaque milieu complet est constitué d'un milieu de base et d'un supplément.

2.2.1 MILIEU DE TRANSPORT ET DE CONSERVATION

✧ **Le milieu de base est constitué de :**

- Bouillon Trypticase-soja 30 g
- Eau distillée 1 000 ml

La poudre a été dissoute à chaud, le pH ajusté à 6,1-6,3 et le milieu ensuite réparti dans des flacons et auto clavé.

✧ **Milieu complet**

▪ Milieu de base	80 ml
▪ Sérum de poulain	20 ml
▪ Extrait de levure	1,5 ml
▪ L-Cystéine à 4 %	0,25 ml
▪ Polyvitex	1 %
▪ V.C.N.	1 %

Ce mélange a été par la suite homogénéisé et stérilisé par filtration. A ce mélange on a ajouté le milieu complet qui a été réparti dans des tubes à vis sous le volume de 2 ml. Ce milieu peut être conservé à 4° C pendant 3 semaines ou à - 20° C pendant un an.

2.2.2 MILIEUX D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION

Φ **Bouillon urée**

✧ **Le milieu de base est constitué de :**

▪ Bouillon Trypticase soja	30 g
▪ Eau distillée	1 000 ml

La poudre a été dissoute à chaud, le pH ajusté à 6,1 – 6,3. Le milieu ainsi obtenu a été réparti dans les tubes et auto clavé.

✧ **Milieu complet**

▪ Milieu de base	95 ml
▪ Sérum de poulain	5 ml
▪ Extrait de levure	2 ml
▪ Urée	1 ml
▪ L-Cystéine	0,25 ml
▪ Polyvitex	1 %
▪ Rouge de phénol	0,1 ml
▪ V.C.N.	1 %

Ce mélange a été homogénéisé et stérilisé par filtration.

A ce mélange, on a ajouté le milieu de base. Le mélange ainsi obtenu a été réparti dans des tubes sous un volume de 2 ml et peut être conservé à 4° C pendant 3 semaines ou à -20° C pendant un an.

Φ **Bouillon Arginine**

✧ **Le milieu de base**

- | | |
|----------------------|---------|
| ▪ Peptone de soja | 20 g |
| ▪ Chlorure de sodium | 5 g |
| ▪ Eau distillée | 1000 ml |

Le mélange a été homogénéisé et dissout à chaud et réparti dans des flacons.

✧ **Milieu complet**

- | | |
|---------------------|--------|
| ▪ Milieu de base | 65 ml |
| ▪ Sérum de cheval | 10 ml |
| ▪ Extrait de levure | 10 ml |
| ▪ L'Arginine | 01 ml |
| ▪ Polyvitex | 1 % |
| ▪ Rouge de phénol | 0,1 ml |
| ▪ V.C.N. | 1 % |

Le milieu complet a été reconstitué en ajoutant au supplément homogénéisé et filtré le milieu de base. Le pH final a été ajusté à 6,1 – 6,3. Le bouillon obtenu a été réparti sous un volume de 2 ml dans des tubes à vis et peut se conserver à 4° C pendant 3 semaines ou à - 20° C pendant un an.

2.2.3 IDENTIFICATION ET TITRAGE

➤ **Recueil et traitement des prélèvements**

L'échantillonnage était constitué de prélèvements uro-génitaux :

- Prélèvements d'endocol : le prélèvement doit s'effectuer par grattage doux au niveau de la muqueuse afin de recueillir le maximum de cellules auxquelles adhèrent les mycoplasmes.
- Prélèvements de sperme
- Prélèvements urétraux
- Prélèvements d'urine

Ces prélèvements ont été recueillis chez des patients venant en consultation à l'hôpital de Fann, à l'IHS, à l'hôpital Principal de Dakar.

Pour les prélèvements d'endocol et d'urètre, les écouvillons ont été déchargés dans 2 ml de transport.

Pour les prélèvements liquides :

- Le sperme et le premier jet d'urines ont été homogénéisés.
- L'urine mictionnelle a été centrifugée et le culot de centrifugation repris par 0,2 ml d'eau physiologique et 0,2 ml d'échantillon inoculé dans le milieu de transport.

➤ **Ensemencement**

La micro plaque utilisée dispose de 20 puits. Chaque prélèvement a été inoculé dans 4 puits dont 2 pour le bouillon Urée et 2 pour le bouillon Arginine.

Les bouillons ont ensuite été distribués à l'aide d'une micro pipette en raison de 180 µl par puits.

Après avoir homogénéisé le contenu du milieu de transport, 20 µl ont été inoculés dans chaque premier puits des différents bouillons. Après avoir homogénéisé (par aspiration et refoulement) puis changé d'embout, 20 µl du premier puits ont été distribués dans le deuxième puits.

Les micro plaques ont été ensuite recouvertes d'un film adhésif et incubées à 37°C sur un support humide (papier buvard imbibé d'eau) pour éviter la déshydratation du puits.

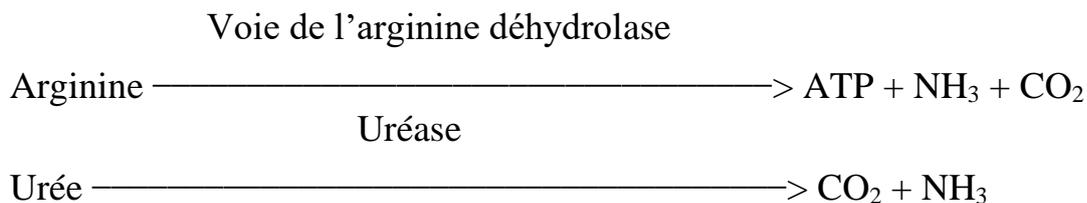
La lecture a été effectuée 24 heures après l'incubation ; en cas de culture négative, la plaque a été réincubée 24 heures supplémentaires pour une dernière lecture.

➤ **Identification**

Φ **Principe**

Le principe est basé sur le métabolisme, en milieu liquide, du substrat présent dans le bouillon (urée ou arginine) par les mycoplasmes, lequel métabolisme est détecté par le virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

Les réactions sont les suivantes :



L'ammoniaque libérée va augmenter le pH dans le bouillon entraînant ainsi le virage du milieu au rouge orange pour l'urée et au rouge framboise pour l'arginine.

Mycoplasma hominis est identifié par sa capacité à métaboliser l'arginine alors que le métabolisme de l'urée est caractéristique de *Ureaplasma urealyticum*.

La croissance des mycoplasmes ne s'accompagne jamais de troubles du milieu qui traduisent une croissance bactérienne.

On peut également observer la croissance des levures qui métabolisent certains constituants du milieu en libérant des substances basiques. Cette croissance est reconnue par un trouble et / ou un dépôt blanchâtre.

➤ *Titration*

En raison de la dualité de leur état commensal ou pathogène, l'interprétation de leur isolement à partir de prélèvements génitaux chez l'adulte doit tenir compte de critères quantitatifs.

▫ **Principe**

Le principe est basé sur des dilutions successives opérées dans le milieu de transport puis dans les milieux d'identification.

▫ **Méthode**

Le premier jour, chaque prélèvement a étéensemencé jusqu'à la dilution 10^{-2} pour un screening, et le milieu de transport conservé à 4° C.

Le deuxième jour, pour tous les prélèvements positifs à 10^{-2} , le milieu de transport a étéensemencé à des dilutions allant de 10^{-3} à 10^{-9} pour déterminer la dilution finale qui correspond au dernier puits positif. Le titre final a été calculé de la manière suivante :

- Pour les prélèvements effectués par écouvillonnage, l'écouvillon chargé d'environ 20 µl de sécrétions a été déchargé dans 2 ml de milieu de transport soit une dilution au 1/100. La dilution finale est égale à la dernière dilution positive multipliée par 10^{-2} .
- Pour le sperme, et le premier jet d'urine, les prélèvements ont été dilués au 1/10 (0,2 ml dans 2 ml) dans le milieu de transport ; la dilution finale est égale à la dernière dilution positive multipliée par 10^{-1} .
- Pour les urines mictionnelles le titre est obtenu par l'inverse de la dilution finale divisée par 5.

Le titre donné en U.C.C./ml est obtenu par l'inverse de la dilution finale.

2.3 PREPARATION DES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES

2.3.1 SOLUTIONS DE STOCK

▪ Principe

Il est basé sur la préparation d'une solution mère 200 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure de l'antibiotique considéré dans le solvant approprié.

▪ Préparation

Les masses à peser dépendant de l'activité de ces antibiotiques.

L'activité d'un antibiotique est la quantité de principe actif en microgramme contenu dans un mg de produit.

La formule que nous avons utilisée pour préparer ces solutions est la suivante :

$$\text{Quantité à peser (mg)} = \frac{\text{Activité (mg \setminus mg)}}{\Delta (\text{mg}) \times C (\text{mg \setminus mg})}$$

▪ Conservation

Les poudres ont été conservées 4°C ou selon les indications du fabricant. Elles restent stables pendant longtemps.

Les solutions mères ont été conservées à 70°C. Elles restent stables pendant un an.

2.3.2 CONCENRATION CRITIQUE SUPERIEUR (C.C.S.)

La solution mère contient la quantité requise de produit pour obtenir, par une dilution au 1/100 avec le diluant approprié et une dilution ultérieure au 1/2 par le milieu utilisé dans la cupule, la C.C.S.

2.3.3 CONCENRATION CRITIQUE INFERIEUR (C.C.I.)

Elle a été obtenue pour chaque antibiotique en faisant une dilution de la C.C.S. Cette dilution a été fonction de la C.C.S. et de la C.C.I. de l'antibiotique.

Tableau 5 : Protocole de préparation des micro plaques pour antibiogramme des mycoplasmes

2.4 DESHYDRATION DES PLAQUES

Après rinçage, les plaques ont été trempées dans l'alcool 70°C pendant 24 heures. On a laissé sécher et on a stérilisé au four micro-onde 10 µl du double de la concentration critique supérieure des antibiotiques et 10 µl de la C.C.I. des antibiotiques donnés ont été respectivement distribués dans les cupules supérieures (C.C.S.) et inférieures ou opposées (C.C.I.) correspondants selon un ordre bien établi. Puis celles-ci ont été portées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C en présence de dessiccateur.

Les plaques déshydratées et munies d'un support ont été scellées dans des sachets stériles avec un dessiccateur et gardées à l'abri de la poussière.

2.5 L' ANTIBIOGRAMME

Il est réalisé lorsque le titre infectieux est supérieur à 10^5 U.C.C./ml.

2.5.1 PREPARATION DE L'INOCULUM

Afin d'ensemencer l'antibiogramme avec un inoculum de 10^3 à 10^5 U.C.C./ml, il est indispensable de faire une pré-culture du milieu ensemencé avec le prélèvement.

Cette pré-culture conduit à une multiplication jusqu'à un titre maximum 10^5 à 10^7 U.C.C./ml. Une dilution au 1/100 de cette culture en bouillon urée et en bouillon arginine pour obtenir l'inoculum standardisé.

- Pour *Mycoplasma hominis* :

A partir de la cupule x (à 24 H ou 48 H d'incubation), réaliser une dilution au 1/100 en bouillon arginine (20 µl de x dans 2 ml de bouillon arginine).

- Pour *Ureaplasma urealyticum* :

- à 24 H d'incubation réaliser une dilution au 1/100
- à 48 H d'incubation dans ce cas il est impossible de repartir de la cupule x (les uréaplasmes risquant d'être autolysés) : réaliser en bouillon urée une dilution au 1/10 du milieu de suspension

transport qui a été conservé à +4°C, si la réalisation de l'antibiogramme est différée en attente des résultats de l'identification et de la numération par exemple) est incubé 16 H à 37°C afin de l'enrichir en mycoplasmes. 20 µl de ce bouillon A3 enrichi sont alors repris dans 2 ml de bouillon urée ou arginine (dilution au 1/100).

2.5.2 INOCULATION DE LA PLAQUE

Inoculer 100 µl de cette dilution dans les cupules contenant les antibiotiques déshydratés et deux cupules servant de témoin de croissance, c'est-à-dire exempt d'antibiotiques.

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

2.5.3 LECTURE ET INTERPRETATION

Φ Vérifier la croissance dans des cupules témoins

Φ Interpréter.

- La croissance dans les 2 cupules : souche résistante.
- L'absence de croissance dans les 2 cupules : souche sensible.
- L'absence de croissance dans la cupule C.C.S. et la croissance dans la cupule C.C.I. : souche intermédiaire.
- L'absence de croissance dans la cupule C.C.I. et la croissance dans la cupule C.C.S. : problème technique.

2.5.4 PRECAUTIONS D'EMPLOI

Il est nécessaire d'associer un examen microscopique à l'état frais du bouillon A₃.

La confirmation d'une culture positive se fait par repiquage sur milieu solide (gélose A₇) avec observation de colonies caractéristiques de chaque

espèce. Mais le coût élevé de la gélose A₇ ne permet pas toujours son utilisation en routine dans les laboratoires d'analyses médicales.

Le virage au rouge de l'indicateur de fin réaction (parfois accompagné d'un trouble du bouillon) peut traduire une croissance microbienne autre que celle des mycoplasmes.

2.6 CONTROLE DE QUALITE

Des souches correspondantes à *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* (I.P.D.) ont été utilisées pour le contrôle des différents lots de réactifs pour l'Identification et l'Etude de la Sensibilité aux antibiotiques.

Ces souches de référence ont permis de valider les tests conçus pour l'identification, le titrage et la sensibilité. Les tests ont été considérés comme valables lorsque la reproductibilité, l'efficacité, la sensibilité et la spécificité ont été totales avec ces souches de référence.

Avant utilisation, des tests de stérilité et de stabilité ont aussi été effectués. Seuls les tests stériles et stables dans le temps ont été utilisés.

CHAPITRE 2 :

RESULTATS ET COMMENTAIRES

2.1 POPULATION D'ETUDE

Dans le cadre de cette étude, nous avons analysé 273 prélèvements de femmes adultes à l'aide de micro plaques Mycoplasmes CSB Système. Nous n'avons pas pu obtenir de prélèvements urétraux, ni de prélèvements de sperme, ces prélèvements étant demandés très rarement.

Les prélèvements de patientes provenaient de :

- Services hospitaliers :
 - Institut d'Hygiène Sociale,
 - Laboratoire de bactériologie de l'Hôpital de Fann,
 - Laboratoire de biologie de l'Hôpital Principal de Dakar.
- Service extra hospitalier : laboratoire privé.

Tableau 6 : Répartition des prélèvements selon le service d'origine

ORIGINE	NOMBRE DE PRELEVEMENTS
IHS	180
Laboratoire de biologie de l'HPD	54
Laboratoire de bactériologie de Fann	14
Laboratoire privé	25
TOTAL	273

La quasi totalité des patientes était des externes, les deux seuls prélèvements de malades hospitalisées provenaient de l'Hôpital Principal.

Le groupe de patientes le plus représentatif était le groupe des prostituées venant en consultation à l'IHS, soit la population d'étude la plus active sexuellement (68 souches) (*Tableau 6*).

2.2 LES SOUCHES IDENTIFIEES

Sur ces 273 prélèvements génitaux féminins, 110 étaient considérés comme positifs c'est à dire responsables d'infections. Nous avons identifié :

- *Ureaplasma urealyticum* seul dans 68 prélèvements
- *Mycoplasma hominis* seul dans 2 prélèvements,
- *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* associés dans 40 prélèvements.

Tableau 7 : Répartition des souches de Mycoplasmes selon le service d'origine

ORIGINE		NOMBRE DE SOUCHES	
		<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
IHS	Centre des MST	33	12
	Prostituées	41	27
Laboratoire de biologie de l'HPD		23	02
Laboratoire de bactériologie de Fann		08	00
Laboratoire privé		03	01
TOTAL		108	42

2.3 TITRAGE

Plusieurs prélèvements ont été testés jusqu'à des dilutions de 10^{-9} . Le titre moyen obtenu est de 10^7 UCC/ml de sécrétions.

2.4 SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Huit antibiotiques appartenant à trois familles différentes (les macrolides, les quinolones, les cyclines) ont été testés et pour chacun d'entre eux ont été déterminés, en fonction des concentrations critiques inférieure et supérieure, le nombre et le pourcentage de souches sensibles, intermédiaires et résistantes des mycoplasmes.

Tableau 8 : Profil de sensibilité des souches de Mycoplasmes aux antibiotiques

ANTIBIOTIQUES TESTES	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (N = 108)			<i>Mycoplasma hominis</i> (N = 42)		
	Sensible	Intermédiaire	Résistante	Sensible	Intermédiaire	Résistante
Tétracycline	95	6	7	35	3	4
Doxycycline	99	4	5	37	1	4
Ofloxacine	87	19	2	42	0	0
Péfloxacine	89	16	3	38	2	2
Ciprofloxacine	99	9	0	38	4	0
Erythromycine	21	58	29	2	0	40
Lincomycine	2	6	100	30	8	4
Clarithromycine	8	2	0	1	2	0

Des histogrammes représentant la sensibilité des souches par rapport à chaque antibiotique ont été réalisés (Graphique 1 et 2).

2.4.1 SENSIBILITE AUX CYCLINES

Les taux de résistance de *Mycoplasma hominis* à la tétracycline et à la doxycycline étaient simultanément de 9,52 %.

Des souches de *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* ont été dans l'ensemble sensibles aux tétracyclines avec 83,33 % de souches de *Mycoplasma hominis* et 87,96 % de souches de *Ureaplasma urealyticum* sensibles.

Nous avons aussi observé une très bonne activité de la doxycycline sur *Mycoplasma hominis* (88,9 %) et sur *Ureaplasma urealyticum* (91,7 %).

Dans cette étude, la tétracycline a montré une meilleure activité sur *Ureaplasma urealyticum* que sur *Mycoplasma hominis*. La doxycycline a été plus active que la tétracycline sur les deux souches de mycoplasmes. Elle a été également plus active sur les souches de *Ureaplasma urealyticum* que sur celles de *Mycoplasma hominis*.

2.4.2 SENSIBILITE AUX MACROLIDES

■ **Erythromycine**

Son action a été nulle sur 95,24 % des souches de *Mycoplasma hominis*, les souches sensibles l'ont été avec seulement 4,76 %. L'absence de souches intermédiaires est à noter, alors que sur *Ureaplasma urealyticum*, plus de la moitié des souches sont classées intermédiaires à cette molécule (53,70 %) avec un pourcentage de souches résistantes assez élevé (26,86 %).

■ **Lincomycine**

Nous avons observé l'effet inverse avec cet antibiotique : les souches d'*Ureaplasma urealyticum* sont apparues sensibles à la lincomycine que les souches de *Mycoplasma hominis*.

■ **Clarithromycine**

La clarithromycine qui n'a été testée que sur 10 souches de *Ureaplasma urealyticum* et trois de *Mycoplasma hominis* est apparue très active sur *Ureaplasma urealyticum* inhibant huit sur 10 souches.

2.4.3 SENSIBILITE AUX QUINOLONES

■ **Ofloxacin**

Il n'y a eu ni de souches intermédiaires, ni de souches résistantes. Toutes les souches de *Mycoplasma hominis* étudiées ont été sensibles à cette molécule.

Par contre, elle n'a été vraiment efficace que sur 80,55 % des souches d'*Ureaplasma urealyticum* malgré un taux de souches résistantes très faible (1,85 %). Le taux de souches intermédiaires étant assez élevé (17,6 %).

■ **Ciprofloxacine**

Pour cette molécule, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* n'ont pas présenté de souches résistantes, mais 9,52 % des souches de *Mycoplasma hominis* ont été intermédiaires avec un pourcentage de sensibilité assez élevé (90,48 %).

De même, 8,34 % des souches de *Ureaplasma urealyticum* ont été intermédiaires avec un pourcentage de sensibilité de 91,66 %.

La ciprofloxacine a une activité comparable sur ces deux souches.

■ Péfloxacine

Elle a été relativement moins active sur les deux souches par rapport aux autres quinolones, bien que le taux de souches résistantes ait été faible (2,78 % pour *Ureaplasma urealyticum* et 4,76 % pour *Mycoplasma hominis*).

Elle a agi sur 82,40 % des souches de *Ureaplasma urealyticum* avec un pourcentage de souches intermédiaires assez élevé (14,82 %).

Cette molécule a eu une meilleure activité sur *Mycoplasma hominis* (90,48 %) et un pourcentage de souches intermédiaires plus faible que celui de *Ureaplasma urealyticum* (4,76 %).

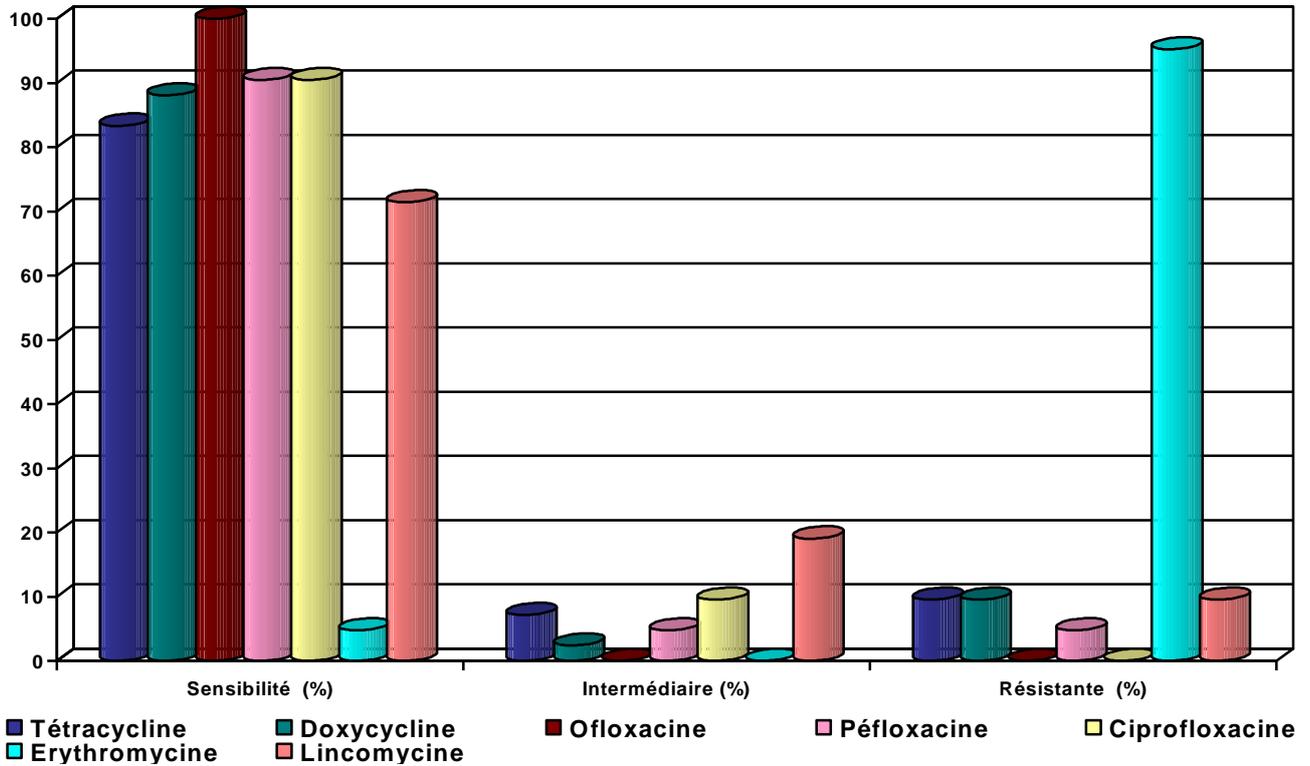
En résumé, le tableau 8 a montré la sensibilité de toutes les souches de *Mycoplasma hominis* et de *Ureaplasma urealyticum* isolées et collectées, aux cyclines, aux macrolides et aux quinolones.

Les cyclines ont montré une meilleure activité sur *Ureaplasma urealyticum*. La doxycycline était la plus active sur les deux espèces de mycoplasmes.

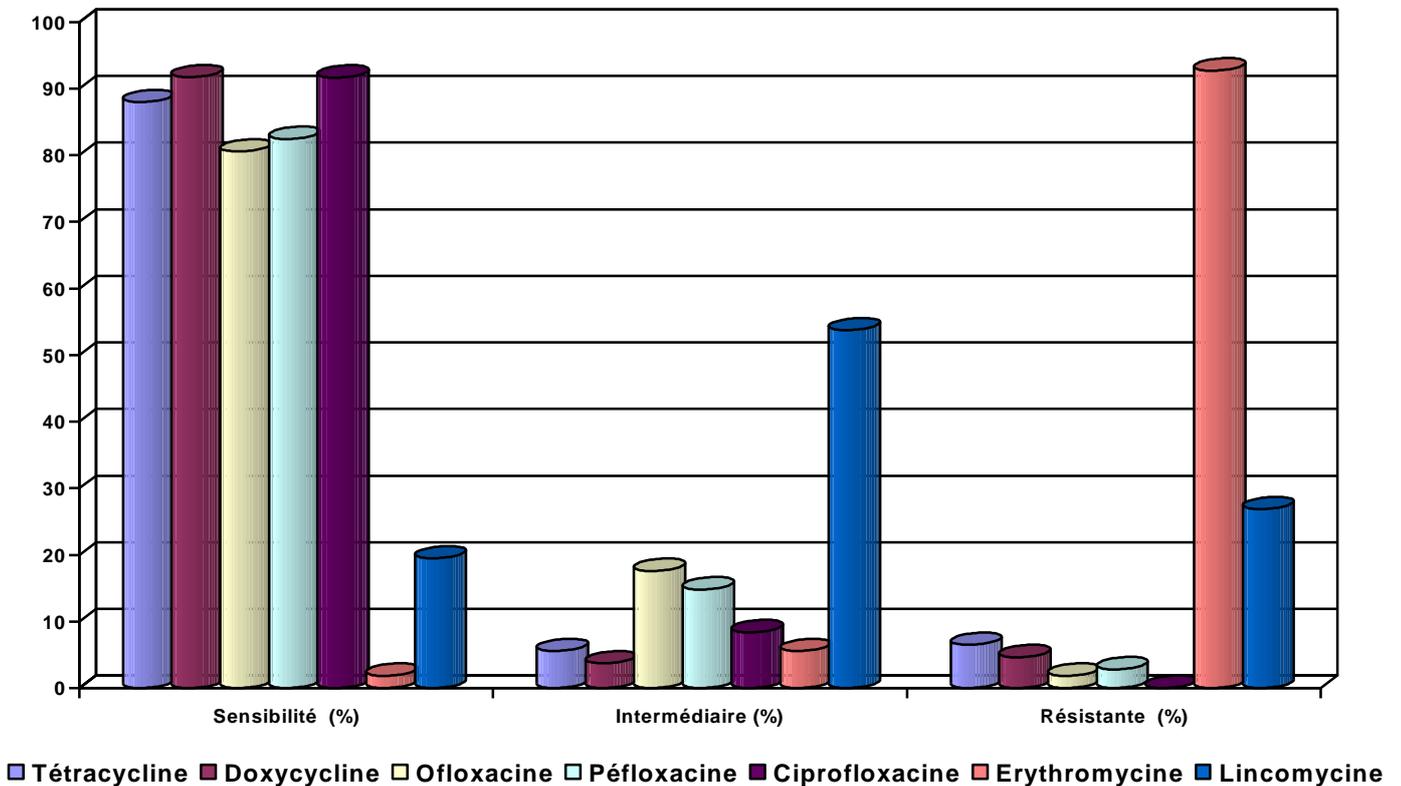
Par contre, certaines quinolones étaient plus actives sur *Mycoplasma hominis* : Ofloxacine était hautement active sur *Mycoplasma hominis* (100 % de sensibilité) suivie par la Ciprofloxacine avec une résistance nulle également mais avec quelques souches intermédiaires (9,52%).

La lincomycine a eu une activité modérée sur *Mycoplasma hominis* et faible sur *Ureaplasma urealyticum*. Par contre l'Erythromycine a eu une activité faible sur *Ureaplasma urealyticum* et quasiment nulle sur *Mycoplasma hominis* (seulement deux souches sensibles).

Graphique 1 : Profil de sensibilité des souches de *Mycoplasma Hominis* aux antibiotiques



Graphique 2 : Profil de sensibilité des souches de *Ureaplasma urealyticum* aux antibiotiques



↳ Répartition des phénotypes de résistance de *Ureaplasma urealyticum*

Nous avons effectué une répartition des phénotypes de résistance des différents antibiotiques étudiés : Tétracycline, Doxycycline, Ofloxacine, Péfloxacine, Ciprofloxacine, Erythromycine, Lincomycine et Clarithromycine.

La répartition des phénotypes de résistance aux macrolides des souches de *Ureaplasma urealyticum* ont montré une plus grande fréquence du phénotype **L** par rapport au phénotype **E**. Toutes les souches résistantes à l'érythromycine l'ont été pour la lincomycine. 64 souches ont développé uniquement le phénotype **L** et 29 ont développé en même temps le phénotype **E+L**.

Parmi les sept souches résistantes à la tétracycline, trois ont développé en même temps **T+D** et quatre uniquement le phénotype **T**.

Parmi les cinq souches résistantes à la doxycycline, deux ont développé uniquement le phénotype **D**. Mais deux ont également le phénotype **E+L** en plus du phénotype **D**.

La répartition des phénotypes de résistance aux quinolones a montré que deux souches résistantes à l'ofloxacine le sont en même temps que la péfloxacine.

Une seule souche a développé uniquement le phénotype **P** et deux souches de phénotype **O+P**.

Toutes les souches de *Ureaplasma urealyticum* résistantes aux différents antibiotiques étudiés ont développé le phénotype **L**.

24 souches ont développé uniquement le phénotype **E+L**. Parmi les cinq autres ayant développé ce phénotype, nous avons obtenu un phénotype **T+E+L**, un phénotype **D+T+E+L**, un **P+E+L** et deux souches ayant développé un phénotype **D+E+L**.

↳ Répartition des phénotypes de résistance de *Mycoplasma hominis*

Le tableau 10 montre une grande fréquence de phénotype de résistance E.

Parmi les 42 souches de *Mycoplasma hominis*, 40 ont développé le phénotype E dont 34 uniquement ce phénotype. Deux souches sont résistantes simultanément à la lincomycine et à l'érythromycine. Deux autres souches ont développé le phénotype **E+L** et ont été également résistantes à la tétracycline.

Une de ces deux souches a aussi résisté à la doxycycline.

Parmi les trois souches résistantes à la tétracycline, 2 ont développé le phénotype **D+T**.

Tableau 9 : Répartition des phénotypes de résistance de *Ureaplasma urealyticum*

Tableau 10 : Répartition des phénotypes de résistance de *Mycoplasma hominis*

CHAPITRE 3 :

DISCUSSION

3.1 ORIGINE DE SOUCHES

Dans cette étude, l'échantillonnage devait concerner les hommes et les femmes venus faire des prélèvements génitaux dans les différents laboratoires de bactériologie précédemment cités (cf. chapitre Matériels et Méthodes).

Du fait du faible recrutement des hommes, elle a été exclusivement orientée vers les infections génitales chez la femme.

Cette exclusivité de femmes s'explique par le fait que celles-ci consultent pour plusieurs raisons :

- Contraception orale et mécanique ;
- Bilan de surveillance d'une grossesse ;
- Bilan de stérilité ;
- Bilan après accouchement ;
- En cas d'affection de la sphère uro-génitale, etc.

alors que les hommes ne consultent qu'en cas de manifestations cliniques.

La suite de l'étude permettra d'avoir une idée plus précise sur la population masculine.

45,34 % des patientes étaient constituées de prostituées venant en consultation à l'IHS. En effet, les infections à mycoplasmes sont majoritairement rencontrées chez les populations à partenaires multiples qui est un facteur favorisant. Certains auteurs ont proposé que les infections à mycoplasmes de l'adulte soient incluses sur la liste des infections opportunistes du SIDA [18, 22, 45, 49].

Ureaplasma urealyticum a été impliqué dans les pertes fœtales, chorioamniotites, prématurité, pneumonie néonatale et méningite. Il pourrait exister un rapport entre la colonisation de *Ureaplasma urealyticum* et les maladies chroniques du poumon [67], de même la présence de *Ureaplasma urealyticum* dans le bassinnet pourrait être liée à celle des calculs infectés [63].

3.2 REPARTITION DES SOUCHES

Nous avons isolé 150 souches de mycoplasmes génitaux des prélèvements génitaux des femmes adultes.

Nous avons noté une prédominance de *Ureaplasma urealyticum* (72 % de souches de mycoplasmes) soit 108 souches et 42 souches de *Mycoplasma hominis* soit 28 %. Cette répartition concorde avec celle retrouvée dans d'autres études : selon **Aksaray S. et coll.** [2], les infections à *Ureaplasma urealyticum* représentent 78 % des agents pathogènes chez les hommes atteints d'urétrite.

Un travail similaire effectué à l'IPD chez des femmes externes atteintes de vaginoses bactériennes [13], les auteurs ont observé des taux élevés de mycoplasmes génitaux à prédominance *Ureaplasma urealyticum*.

Une autre étude a été effectuée (de 1992 à 1996) sur l'évaluation de la fréquence de *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* chez la femme : **Blanco M.A et coll.** [14] ont constaté que la fréquence d'isolement d'*Ureaplasma urealyticum* a augmenté significativement (14,3 %) ces dernières années, il n'y a pas eu de différence significative dans celle de *Mycoplasma hominis* (0,15 %).

3.3 CSB SYSTEME MYCOPLASMES

L'identification et la sensibilité ont été étudiées par la méthode CSB Mycoplasme.

Plusieurs travaux effectués sur cette technique ont approuvé et confirmé la sensibilité, la spécificité, la facilité, la reproductibilité et le coût relativement bas de cette méthode.

Les auteurs de ces travaux l'ont comparé avec les méthodes classiques d'identification et d'étude de la sensibilité des mycoplasmes aux antibiotiques et ont trouvé une bonne corrélation [23, 50].

En effet, des tests simples et à bon prix sont nécessaires dans nos pays en voie de développement où les coûts des tests et de la thérapie représentent des facteurs majeurs dans le contrôle des MST.

3.4 SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

3.4.1 LES CYCLINES

3.4.1.1 Sensibilité de *Ureaplasma urealyticum* aux cyclines

■ TETRACYCLINE

Dans notre étude, les résultats obtenus nous montrent que 6,49 % de souches de *Ureaplasma urealyticum* sont résistantes à la tétracycline. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans une étude effectuée en Espagne par **Herrero A. et coll.** [35]. Les souches d'*Ureaplasma urealyticum* ont montré 6,6 % de résistance à la tétracycline.

Par contre, ces taux sont un peu plus élevés que ceux donnés par certains auteurs. 4,5 % de souches de résistances sont observées dans une étude effectuée en Croatie avec le test de commerce Mycoplasma IST [61] de même dans une étude plus globale menée de 1993-1998 en Allemagne [43], ces auteurs avaient trouvé un taux de résistance de 4,12 %.

■ DOXYCYCLINE

Dans notre étude, 4,63 % de souches de *Ureaplasma urealyticum* ont résisté à l'action de cette molécule. Des fréquences de résistance un peu plus faibles ont été rapportées par la littérature : 3,4 % en Allemagne, 3,3 % en Espagne et 2,3 % en Croatie [35, 43, 61].

Nos travaux confirment ainsi une diminution de l'activité des cyclines sur les souches de *Ureaplasma urealyticum* isolées.

3.4.1.2 Sensibilité de *Mycoplasma hominis* aux cyclines

9,52 % des souches de *Mycoplasma hominis* sont résistantes aux deux cyclines étudiées (tétracycline et doxycycline). Ces taux sont comparables à ceux de **Krausse R. et coll.** [43] dans une récente étude : 10,97 % de résistance pour les deux antibiotiques.

Les deux cyclines ont montré une meilleure activité sur *Ureaplasma urealyticum*. Cela confirme la littérature [43] bien que les fréquences retrouvées dans certaines études soient variables.

Krausse R. et coll. [43] ont trouvé dans leur étude, une CMI_{50/90} plus faible pour la doxycycline que pour la tétracycline :

CMI_{50/90} (tétra) = 1µg/ml et 2µg/ml

CMI_{50/90} (doxy) = 0,25µg/ml et 0,50µg/ml sur *Ureaplasma urealyticum*

La doxycycline est quatre fois plus efficace que la tétracycline. Il en est de même pour *Mycoplasma hominis*.

CMI_{50/90} (tétra) = 0,5µg/ml et 8µg/ml et celles de la doxycycline 0,125µg/ml et 4µg/ml. La doxycycline est également 2 à 4 fois plus efficace sur *Mycoplasma hominis* que la tétracycline.

Le taux de résistance des mycoplasmes aux cyclines était significativement plus élevé durant les années 1993-1995 que celui retrouvé entre 1988-1992 (7,7-3,8% respectivement) [43].

Une hausse de la résistance était aussi observée pour *Mycoplasma hominis* durant les années 1981-1991 par rapport aux années 1992-1998 [43].

L'augmentation de la résistance des mycoplasmes génitaux aux cyclines est un sérieux problème, ce groupe d'antibiotique étant l'un des plus efficaces sur pratiquement toutes les espèces de mycoplasmes. Les cyclines sont utilisées pour traiter les MST [26].

Le comportement des souches de mycoplasmes vis à vis de cette famille devrait être surveillé dans les années à venir du fait de la consommation

importante de cet antibiotique pour traiter les MST surtout avec les prostituées qui sont sujettes à des infections fréquentes de la sphère génitale.

Ces résultats traduisent une augmentation de la résistance des mycoplasmes à la tétracycline, résistance due à l'acquisition par les mycoplasmes du gène Tet (M) qui est un déterminant récemment acquis chez ces espèces. Il semblerait que cette structure soit une mosaïque à l'intérieur du Tet (M) et qui évolue par acquisition de nouveaux éléments [7, 8, 52].

Il faut également signaler que cette molécule ne constitue pas toujours un antibiotique de choix dans le traitement des mycoplasmes. La tétracycline est un antibiotique dont l'utilisation doit être évitée chez les femmes enceintes et les nouveau-nés car elle provoque une coloration en jaune des dents par fixation sur l'émail dentaire.

3.4.2 LES QUINOLONES

■ L'OFLOXACINE

Aucune souche de *Mycoplasma hominis* n'a été trouvée résistante.

Cependant, des taux de 1,3% de résistance ont été signalés en Allemagne [43].

Dans notre étude, 1,89 % des souches de *Ureaplasma urealyticum* sont résistantes à l'action de l'ofloxacin avec un pourcentage de sensibilité intermédiaire relativement élevé. Ce taux est confirmé par la littérature [43, 61].

Cependant, les fréquences varient dans certaines études. Ainsi, 1,4 % de résistance ont été retenus en Allemagne, 2,3 % en Croatie, 8,8 % en Espagne et un pourcentage de sensibilité intermédiaire très élevé (48,8 %) en Croatie [35, 61].

Cette absence de résistance retrouvée dans notre étude pourrait être due à l'utilisation rare de cette molécule à cause de son coût relativement élevé.

■ LA CIPROFLOXACINE

La résistance des souches de mycoplasmes que nous avons étudiée pour ce produit est nulle. Cependant, nous avons trouvé un nombre relativement élevé de souches à sensibilité intermédiaire pour cet antibiotique (9,52 % pour *Mycoplasma hominis* et 8,34 % pour *Ureaplasma urealyticum*).

D'autres auteurs ont trouvé un faible taux de résistance à la ciprofloxacine [43]. Cela pourrait s'expliquer par le taux de souches à sensibilité intermédiaire que nous avons obtenu.

■ LA PEFLOXACINE

Les résultats que nous avons obtenus nous ont montré que 4,76 % des souches de *Mycoplasma hominis* et 2,7 % de *Ureaplasma urealyticum* sont résistantes à la péfloxacine. Ces résultats sont comparables avec ceux des auteurs [43].

Les quinolones ont eu en général une bonne activité sur *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*. Elles ont montré une meilleure activité sur *Mycoplasma hominis* contrairement à la tétracycline.

D'après la littérature [1], les quinolones auraient une activité modérée sur *Mycoplasma hominis* mais pauvre sur *Ureaplasma urealyticum*.

L'activité des quinolones sur les mycoplasmes est variable d'un pays à un autre. Cela pourrait être une explication au fait que le pourcentage de résistance trouvé dans notre étude soit un peu différent pour ceux décrits dans d'autres.

D'autres auteurs ont montré que la ciprofloxacine et la péfloxacine étaient plus actives sur *Mycoplasma hominis* et l'ofloxacine, la quinolone qui avaient la meilleure activité sur *Ureaplasma*

urealyticum [43]. Par contre, ofloxacin et ciprofloxacine étaient celles qui avaient la meilleure activité sur *Mycoplasma hominis*.

D'après les études **Krausse R. et coll.** [43], les $CM_{50/90}$ de l'ofloxacin et de la ciprofloxacine étaient plus faibles que celles de la péfloxacine pour *Mycoplasma hominis* tandis que pour *Ureaplasma urealyticum*, celles de l'ofloxacin étaient plus faibles que celles des deux autres quinolones.

D'autres auteurs ont comparé l'activité d'une autre quinolone : la Gatifloxacine par rapport à l'ofloxacin et à la ciprofloxacine sur 10 souches de *Mycoplasma hominis* et 10 d'*Ureaplasma urealyticum* [37]. D'après ces résultats, Gatifloxacine était 10 fois plus active que les deux quinolones précédemment citées sur *Mycoplasma hominis* et sur *Ureaplasma urealyticum* Gatifloxacine pourrait être une alternative dans le traitement des infections mixtes à mycoplasmes.

L'interprétation des résultats doit être corrélée à celle de l'acquisition de résistance des mycoplasmes génitaux aux quinolones. Il faut prendre en compte le mécanisme de résistance le plus fréquent pour éviter tout risque d'échecs thérapeutiques. Dans le cas de l'ofloxacin, de la ciprofloxacine et de la péfloxacine, l'inactivation est due à une altération au niveau des sous-unités de la topo isomérase IV tandis que dans le cas de la sparfloxacine, une nouvelle quinolone, la modification se situe au niveau de l'ADN-gyrase. A propos de la sparfloxacine, une faible valeur de $CM_{90} = 0,03\mu\text{g/ml}$ a été trouvée pour cette molécule dans une étude effectuée par E-TEST [66]. Cette quinolone semble plus efficace que les autres sur les mycoplasmes et aussi par rapport à une association de macrolides bactéricides (Quinupristin-Dalfopristin) du fait de sa plus faible CM_{90} , les autres quinolones ayant des CM_{90} plus élevées bien que faibles ($CM_{90} = 0,06$).

3.4.3 LES MACROLIDES

☞ L'ERYTHROMYCINE

Ureaplasma urealyticum présente une faible sensibilité à cet antibiotique (19,45 %) et une sensibilité intermédiaire (53,70 %).

Le taux de sensibilité intermédiaire est comparable à celui d'une autre étude effectuée en Croatie [61]. Des fréquences de sensibilité plus faibles ont été rapportées par d'autres études : 1,2% en Croatie et 5,5% en Espagne [35, 61]. *Mycoplasma hominis* est quasiment insensible à cet antibiotique. L'inefficacité de ce produit sur les souches de *Mycoplasma hominis* doit être prise en compte car elle est également aussi élevée dans d'autres études (95,57 %) [43].

Cette inefficacité est confirmée par plusieurs études. Les souches de *Mycoplasma hominis* testées par **Furneri et coll.** [31] ont montré une résistance uniforme. Cette espèce était déjà connue pour sa résistance à l'érythromycine.

A ce titre, les valeurs de la CMI_{50/90} trouvée dans les études de **Krause R.** [43] sont assez révélatrices ($\geq 16\mu\text{g/ml}$).

☞ LA LINCOMYCINE

Nous avons constaté une très grande résistance de *Ureaplasma urealyticum* (92,70 %). Cette espèce est connue par sa résistance à cet antibiotique.

De même, cette molécule est inefficace vis à vis de *Mycoplasma hominis* mais de façon moindre par rapport à *Ureaplasma urealyticum*.

Les chiffres trouvés témoignent d'une forte résistance des mycoplasmes aux macrolides en général, résistance qui s'étend aux lincosamines.

☞ LA CLARITHROMYCINE

L'activité de la clarithromycine n'a pu être étudiée que sur 10 souches de *Ureaplasma urealyticum* et trois de *Mycoplasma hominis*. Aucune résistance n'a pu être constatée. Mais d'après les études effectuées, clarithromycine est plus efficace sur *Ureaplasma urealyticum*. Parmi les macrolides étudiés en général, la clarithromycine faisait partie des antibiotiques les plus actifs sur *Ureaplasma urealyticum* [29, 31, 58].

D'autres auteurs ont comparé l'activité d'autres molécules telle que l'Azithromycine qui est plus active que l'Erythromycine sur *Mycoplasma hominis* [58].

La Clindamycine est hautement active sur *Mycoplasma hominis* mais inefficace sur *Ureaplasma urealyticum* [1].

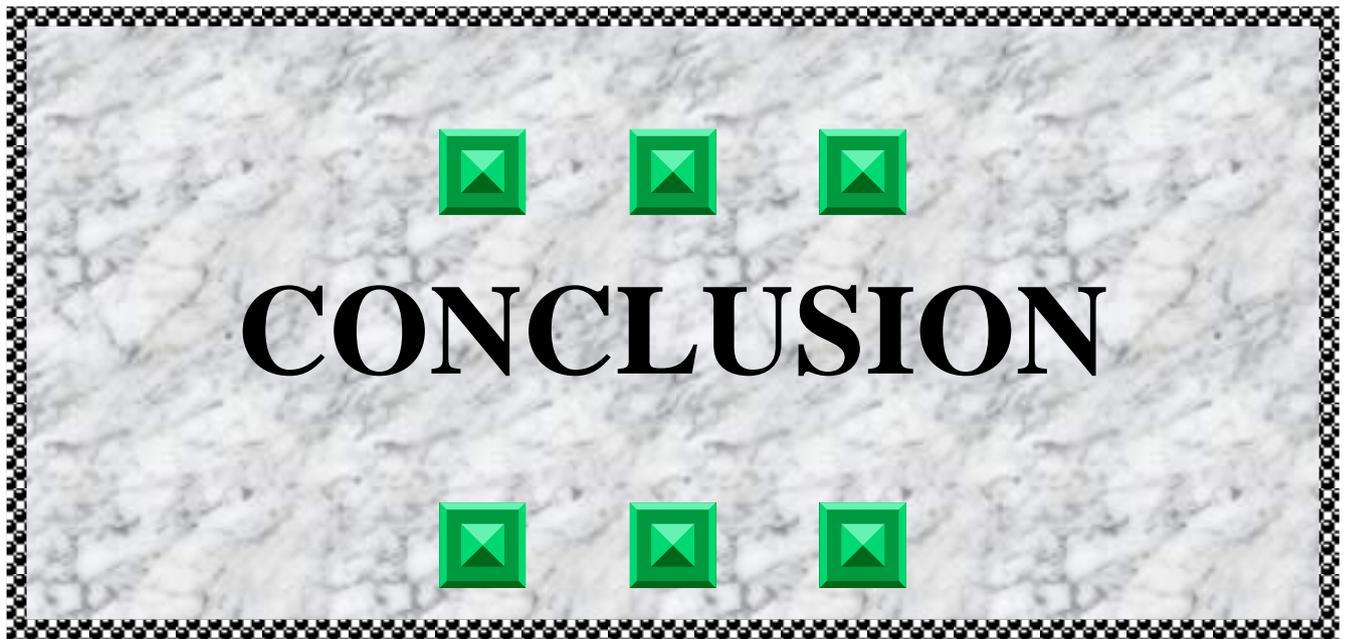
Dans une autre étude, des auteurs [29] ont déterminé l'activité « in vitro » de la Roxythromycine, de la Clarithromycine, de l'Azithromycine et de la Midécamycine sur des souches de *Ureaplasma urealyticum* et de *Mycoplasma hominis*. Les antibiotiques tels que l'Erythromycine, la Roxythromycine, la Clarithromycine et l'Azithromycine ont été faiblement actifs sur les souches de *Mycoplasma hominis* isolées. Par contre, les mêmes isolats étaient sensibles à la Midécamycine. *Ureaplasma urealyticum* était sensible à tous ces antibiotiques.

↳ PHENOTYPES DE RESISTANCE DES MYCOPLASMES

Dans le cas de *Mycoplasma hominis*, on a une prédominance du phénotype **E** par rapport aux autres familles d'antibiotiques. Par contre, dans le cas d'*Ureaplasma urealyticum*, on a une prédominance du phénotype **L**.

Les différences d'activité entre familles d'antibiotiques s'expliqueraient par le fait que les facteurs de résistance soient différents d'un antibiotique à un autre [8, 52].

Ce phénotypage peut trouver toute son importance dans le choix de l'antibiotique à prescrire ou bien dans le double choix des associations d'antibiotiques pour traiter les infections à mycoplasmes.



Nous avons entrepris ce travail dans le but d'étudier l'activité des différents antibiotiques généralement utilisés en thérapeutique sur les mycoplasmes. L'intérêt de cet objectif réside dans le fait que les infections à mycoplasmes constituent un réel problème de santé non seulement par leur gravité, leur conséquence et leur fréquence mais surtout du fait de l'apparition au cours de ces dix dernières années de souches résistantes voire multi-résistantes signalées un peu partout dans le monde. Cette résistance a d'abord intéressé les macrolides, puis les tétracyclines et gagne petit à petit les quinolones.

Notre étude a porté 108 souches de *Ureaplasma urealyticum* et 42 *Mycoplasma hominis* isolées et identifiées entre le mois de septembre 1998 et le mois de mars 1999 dans différentes structures hospitalières.

La sensibilité de ces souches par rapport aux différents antibiotiques a été déterminée par la méthode CSB Système Mycoplasme adaptée à la routine et qui offre plusieurs avantages parmi lesquels la sécurité d'identification des mycoplasmes et de diagnostic par la méthode des dilutions permettant de déterminer le titre élevé d'un prélèvement, par conséquent d'interpréter plus facilement l'implication des mycoplasmes dans certaines pathologies,

Au cours de cette étude, nous avons noté que huit souches de *Ureaplasma urealyticum* et deux de *Mycoplasma hominis* ont été sensibles à tous les antibiotiques étudiés.

Sur *Mycoplasma hominis*, ofloxacin avait montré une excellente activité sans développement de résistance (100 %).

Sur *Ureaplasma urealyticum*, ciprofloxacine avait montré sa meilleure activité (soit 91,66 % de souches sensibles).

Ureaplasma urealyticum et *Mycoplasma hominis* sont très peu sensibles à l'érythromycine puisque 53,70 % des souches de *Ureaplasma urealyticum* présentent une sensibilité intermédiaire et 95,24 % des souches de *Mycoplasma hominis* sont résistantes.

Ureaplasma urealyticum et *Mycoplasma hominis* sont toujours sensibles aux cyclines malgré quelques cas de résistance. Cette famille a toujours sa place en thérapeutique même si l'apparition de résistance aux cyclines due à la présence d'un gène Tet (M) remet totalement en cause le traitement de référence des infections à mycoplasmes et laisse ainsi le thérapeute dans l'embarras du fait de la remarquable habilité des mycoplasmes à développer des résistances à presque tous les antibiotiques utilisés en thérapeutique.

Les quinolones pourraient être utilisées comme une alternative aux cyclines et à l'érythromycine dans les infections mixtes à *Mycoplasma hominis* et à *Ureaplasma urealyticum*.

Cependant, la faible résistance des mycoplasmes aux quinolones ne doit nullement exclure des mesures préventives surtout qu'un pourcentage assez significatif de souches à sensibilité intermédiaire a été déterminé dans certains pays.

Des pays comme les Etats-Unis et l'Allemagne essaient de contourner ce problème de résistance par l'étude et l'utilisation de nouvelles molécules. A ce titre, la Josamycine, hautement active sur *Mycoplasma hominis* *Ureaplasma urealyticum* et pourrait être utilisée en remplacement des cyclines et de l'érythromycine dans les infections mixtes. Cette molécule ne constitue pas une contre indication chez les femmes enceintes et les enfants nouveau-nés. De même que la clarithromycine et la clindamycine montrent respectivement une excellente activité sans développement de résistance sur *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*.

Dans cette même optique, l'utilisation de nouvelles fluoroquinolones (sparfloxacin, gatifloxacin) et une association bactéricide de streptogramines (quinupristin-dalfopristin) offrent beaucoup d'espoir.

En définitive, une étroite collaboration entre pharmaciens, cliniciens et bactériologistes, la diffusion et l'échange d'informations et la confrontation des résultats sont indispensables pour supporter le choix d'un traitement efficace et adapté à l'épidémiologie locale. Ces conditions permettraient de limiter l'émergence et la diffusion des souches multi-résistantes et de préserver les molécules les plus actives.

Pour finir, cette prise en charge thérapeutique devra forcément être couplée aux mesures préventives habituelles, à savoir :

- éducation ;
- information ;
- sensibilisation.



- 1- **ABELE-HORN, BECHER, BAUERNFEIND, GERBER, UHLIG, ROOS, HENTSCHEL, PETERS, EMMERLING**

Comparative in vitro susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* to macrolides, tetracyclines, 4-quinolones, chloramphenicol, gentamicin, and clindamycin.

In : antiinfective drugs & chemotherapy, 1996 ; 171-173

- 2- **AKSARAY S., BALABAN N., OKUR O., TEZEREN D., OZTURK S.**

The prevalence of the pathogenic micro organisms in men with urethral discharges.

Clinical Microbiology Infection, MAY 1997, 3 (2), 278

- 3- **AVIL J.L., DABENAT H., DENIS F., MONTEIL H.**

Mycoplasma - Ureaplasma

Bactériologie clinique

Edition Ellipses, Paris, 1988, 39, 481-491

- 4- **BEBEAR C.**

Les infections à mycoplasmes génitaux

Rev. Europ. Dermatol. MST, 1990, 2, 7-14

- 5- **BEBEAR C.**

Les infections à Mycoplasmes en gynécologie obstétrique

Microsoft Internet Explorer, 1-6

- 6- **BEBEAR C. LATRILLE J.**

Mycoplasmes

Dans : Bactériologie médicale Leon-Le Minor

ED. Flammarion Paris, 1990, 1088-1097

- 7- **BEBEAR C. M., CHARRON A., RENAUDIN H., DE BAARBEYRAC B. SCHAEVERBEKE T., BOVE J.M., BEBEAR C.**

Mutations in the gyr A, par C, and par E Genes associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical isolates of *Mycoplasma hominis*.

Abstracts C-43, 38th ICAAC, September 24-27, 1998, San Diego, California.

- 8- **BEBEAR C. M., CHARRON A., RENAUDIN H., T., BOVE J.M., BEBEAR C.**

Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro.

In : Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 1998 Sept., 42 (9) : 2304-11

- 9- **BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMONET M.**

Les mycoplasmes et formes L des bactéries

Bactériologie – Les bactéries des infections humaines

Ed. Flammarion, Médecine- Sciences, Paris, 1988, 53, 506-506

- 10- **BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMONET M.**

Mesure de l'activité antibactérienne des antibiotiques

Bactériologie : Bactéries des infections humaines

Paris, Médecine-Science, Flammarion, 1988 ; 593-600

- 11- **BONISSOL CH.**

Biologie des Mycoplasmes

Bull., Mem. Soc. Med, Paris, Tome III, n°6

- 12- **BONISSOL CH.**

Isolement et identification des Mycoplasmes urogénitaux

Med. Mal. Infect., 1980, 10, 640-646

- 13- **BOTTA G.A., RAPHENON G., BOTTA C., COURDET C.**

Sexually transmitted diseases in senegalese woman

Clinical Microbiology and Infection, MAY 1997, 3, 2, 277

14- **BLANCO M.A., SALAZAR F.J., GOMEZ O. IZQUIERDO F.**

Evolution of the frequency of *U. urealyticum* and *M. hominis* in women during 5 years

Clinical Microbiology and Infection, MAY 1997, **3**, 2, 277

15- **CARRET G., FLANDROIS J.P.**

L'antibiogramme automatisé

Eds, Manuel de Bactériologie clinique, Paris, option biol., 1988, 227-232

16- **CASSEL G.H., WAITES K.B., CROUSE D.T., RUDD P.T., CANUPP K.C., STAGHO S., CUTTE G.R.**

Association of *U. urealyticum* infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very low birth weight infants

Lamat, 1988, 11, 240-244

17- **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

18- **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

19- **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

20- **COPIN E., LEBRUN L.**

Infections à Mycoplasmes urogénitaux

Feuill. Biol., 1991, 181, 9-15

21- CULTRERA R., ROMANI R., ROULLAND-DUSSOIX D., CONTINI C.

Does *U. urealyticum* play a pathogenic role in HIV infected patients ?

Clinical Microbiology and Infection, MAY 1997, 3 ,2, 366

22- DIENG SARR

Les Mycoplasmes

CES Bactériologie-virologie

23- 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

24- DRUGEON H.B., COURTIEU A.L.

Techniques semi-automatisées ou automatisées

Dans : CARBONNELLE B.,

Eds Bactériologie médicale : Techniques usuelles, Paris, SIMEP, 1987, 245-247

25- DUVAL J.

Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens

Dans : LE MINOR L.

Eds bactériologie médicale,

Paris, Médecine-Sciences, Flammarion, 1989, 273-296

26-ECHANIZ-AVILES, CONDE – GONZALEZ, JUAREZ-FIGUEROA, CARMALLA-BARAJAS....

In vitro activity of several antimicrobial agents against genital Mycoplasmas

Clinical therapeutics, 1992, 688-695

27- ESCARGUEL C., PAPIEROK G.

La sérologie des Mycoplasmes urogénitaux

Dans : SPECTRA BIOLOGIE, 1988

28- FARI A.

Recherche et identification d'une infection génitale

Encycl. Méd. Chirurg., Paris, Gynécol, Déc 1986, 73, 1-6

29- FELMINGHAM, ROBBINS, SANGHRAJKA, LEAKEY, RIDGWAY

The in vitro activity of some 14-, 15- and 16- membered macrolides against *Staphylococcus* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., and *U. urealyticum*

Drugs under Experimental and Clinical Research, 1991, 91-99

30- FREUNDT E.A.

Culture for classic mycoplasmas

In : RAZIN S., TULLY J.G.

Methods in Mycoplasmaology, vol.1, Mycoplasma characterization

Academic Press New York, 1986, 305, 137-146

31- FURNERI, CERNIGLIA, BISIGNANO

In vitro mycoplasmal activity of macrolides, fluoroquinolones and tetracyclines

94th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1994

32- GAUDIN O.G

Infections humaines à Mycoplasmes

Encycl. Med. Chirurg., Paris, Maladies Infectieuses, 1989, 9, 1-6

33- GOLDSTEIN F., JONES R., LAMBERT N.

Symposium E-Test

La lettre de l'infectiologie, 1994, 11 (hors série)

34- HENRY S.J.

Infections en gynécologie : les moyens actuels de diagnostic et de traitement

Actualités gynécologiques, 1991, 22, 101-112

- 35- **HERRERO A., CUEVAS 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
- 36- **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
- 37- **HUCZKO E., KOLKEK B., WASHO T., MINASSIAN B...**
 In vitro activity of Gatifloxacin against anaerobes, Mycoplasma, Ureaplasma, and Chlamydia spp.
Abstracts E-182, 38th ICAAC, September 24-27, 1998, San Diego, California..
- 38- **JALIL N. DOBLE A, GILCHRIST C., TAYLOR R.D.**
 Infection of the epididymis by *U. urealyticum*
Genitorius Med, 1988, **64**, 367-368
- 39- **JAMES H., JORGENSEN**
 Antibacterial susceptibility test : automated or instrument based methods
 In : ALBERT B.& al.
Eds Manual of Clinical Microbiology, Washington DC, ASM, 1991, 1166-1171
- 40- **JANSSEN E., HAKKARAINEN K...**
 Mycoplasmas and leukemia
Virology, 1991, **142**, 333
- 41- **KENNY G.E.**
 Mycoplasmas
Manual of clinical microbiology, 5th Ed, 1990, 478-482

42- **KIBSEY P., Mc KAYT, LIMFONG R.**

Rapid detection of *U. urealyticum* and *M. hominis* by mycofast

ASM, Meeting, Dallas, Texas, USA, 5-9 May 1991

43- **KRAUSSE R., SCHUBERT S., ULLMANN U.**

Mycoplasmas/Ureaplasmas : Increase in resistance to tetracyclines, macrolides and quinolones from 1983 to 1998

Clinical Microbiology and Infection, MARCH 1999, 5, 3, 313

44- **LATRILLE J.**

Les Mycoplasmes

Bactériologie médicale Leon-le Minor

Ed Flammarion, Med.Sciences, Paris, 1982, 758-766

45- **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

46- **MARMONIER A.A.**

Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques

Dans : **Carbonnelle B. et coll.**

Bactériologie médicale : Techniques usuelles

Paris, SIMEP, 1987, 227-237

47- **MEYER A., DEIVANA I. , LECLERC H.**

Mesure de l'activité des antibiotiques

Dans : Cours de microbiologie générale

Paris, Doin, 1991, 225-239

48- MICHEL B.Y.

Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques

Dans : LANDRY et coll.

Pharmacologie moléculaire, 2^{ème} Ed Paris, Arnette, 1993, 637-641

49- 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

50- MACONDO E. A.

Mise au point et méthodes d'identification des mycoplasmes

D.E.A. de Chimie et de Biochimie, Dakar 1995

51- NDOUR M.A

Les mycoplasmes dans les infections urogénitales de la femme à Dakar : résultats préliminaires

Thèse Pharm : Dakar, 1988, 57

52- OGGIONI M.R., DOWSON C.G., SMITH J.M., PROVVEDI R. , POZZI G

The tetracycline resistance gene tet (M) exhibits mosaic structure

Plasmid., 1996 May, 35 (3), 156-163

53- PAPIEROK G., PAUTRAT G., ESCARGUEL C.

Les Mycoplasmes : leur place en microbiologie

Revue française des labo., 1992, n°244

54- PILET C., BOURDON J L., TOMA B., MARCHAL N...

Famille des mycoplasmataceae

Bactériologie Médicale et vétérinaire, 1987, 353-359

55- **QUENTIN C.**

L'antibiogramme en urgence

Dans : COURVALIN P. et coll.

L'antibiogramme, 1^{ère} ed, Paris, MPC-Videon, 1985, 145-153

56- **QUENTIN C., CANTET P., RENAUDIN H., BEBEAR C.**

Sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes pathogènes pour l'homme

Pathol. Biol, 1985, 33, 20-212

57- **RENATA C.F., HENRICH B., KOLB B., CHOFEU U., HADDING U.**

Decreased metabolism and viability of *M. hominis* induced by monoclonal antibody mediated agglutination

Infection Imm., 1992, 60, 166-174

58- **RENAUDIN , BEBEAR**

Comparative in vitro activity of azithromycin, clarithromycin, erythromycin, and lomefloxacin against *M. pneumoniae*, *M. hominis* and *U. urealyticum*

European Journal of Clinical Microbiology and infectious Disease, 1990, 838-841

59- **ROBERTSON J.A.**

Potential virulence factors of *U. urealyticum*

Pediatr.Infect. Disease, 1986, 5, S222-S235

60- **ROOT B.R.S., HOBBS S.H.**

Homologies between mycoplasma adhesion peptide, CD4 and class II, MHC proteins

A possible mechanism for HIV, Mycoplasma synergism in AIDS

Res. Immunol., 1991, 142, 519-523

61- SENJI P., ZELE S., KALENIC S.

Susceptibility of *U. urealyticum* to antibiotics

Clinical Microbiology and Infection, MAY 1997, **3**, 2, 277

62- 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

63- STOLK-ENGELAAR M., KUYPER E., LARDENOYE J., SCHROEDER J. PEETERS M.

U. urealyticum and its relation to infected renal calculi

Clinical Microbiology and Infection, MAY 1997, **3**, 2, 192

64- TAYLOR D., ROBINSON

Infections due to species of Mycoplasma and ureaplasma : an update

Clinical infectious diseases, 1996, **23**, 671-684

65- THOUVENOT D., BOSSHARD S.

Les mycoplasmes

Manuel de bactériologie clinique, 1992, **2**, 1205-1218

66- WAITES K.B., CANUPP K.C., KENNY G.E.

Quantitative determination of in vitro susceptibilities of *Mycoplasma hominis* to Fluoroquinolones and Quinupristin-Dalfopristin, using E-tests and commercially prepared media

In : *Abstracts of the 38th ICAAC, September 24-27, 1998, San Diego, California. An annual meeting of the American Society for Microbiology.*

67- WANG E.E.L.

U. urealyticum : is it a cause of chronic lung disease of prematurity (CLD) ?

Clinical Microbiology and Infection, MAY 1997, **3**, 2, 192