

INTRODUCTION

Les mycoplasmes sont des micro-organismes vivants, les plus petits et les plus simples procaryotes connus capables de s'auto-répliquer. Ils se rencontrent dans différents domaines de la vie terrestre, hommes, animaux, plantes, arthropodes.

Initialement confondus avec les virus en raison de leur filtrabilité, ils furent ensuite assimilés à des bactéries parce qu'ils possèdent à la fois de l'ADN et de l'ARN, qu'ils ont une activité métabolique propre et qu'ils peuvent être cultivés sur des milieux acellulaires. Cependant l'absence de paroi les distingue des autres bactéries d'où la classification dans la classe des mollicutes (Mollicutus = peau molle).

Le mycoplasme est une cellule simple contenant l'organisation essentielle pour la croissance et la reproduction d'une membrane plasmique séparant le cytoplasme et l'environnement, une double hélice d'ADN ayant l'information nécessaire à la synthèse des protéines et des ribosomes pour assembler ces protéines.

Le génome des mycoplasmes est typiquement procaryotique et sa taille est la plus petite connue. La principale conséquence du petit génome est la capacité de biosynthèse limitée qui fait du mycoplasme un micro-organisme exigeant présentant un mode de vie particulier limité aux muqueuses chez l'homme et les animaux.

L'absence de données est motivée par la difficulté de leur isolement au laboratoire mais surtout la nécessité d'un tel diagnostic étant donné la controverse sur le rôle pathogène de ce germe malgré qu'il soit connu depuis 1898. La difficulté d'appréciation de leur pouvoir pathogène est surtout due à leur saprophytisme urogénital chez la femme et chez l'homme.

Ces agents sont également incriminés dans des affections dont certaines sont très graves : vaginites non spécifiques, urétrite non gonococcique, salpingites, etc.

Le but de ce travail est :

- D'améliorer les méthodes de diagnostic des mycoplasmes urogénitaux
- De faire une étude préliminaire de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux.

I- HISTORIQUE

Les mycoplasmes sont des micro-organismes ubiquitaires connus dans le règne animal depuis la fin du XIX ème siècle. (3)

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

1898 : NOCARD et ROUX découvrent un agent "filtrable" responsable d'une péripneumonie contagieuse des bovidés avec épanchement pleural. Ils isolent le germe responsable sur milieux artificiels et lui donnent le nom *d'Asterococcus mycoides* (6,30).

Puis de nombreux autres organismes voisins ont été décrits sous le nom de PPLO (pleuro pneumonie like organisms).(1)

1900 : DU JARDIN BAUMETZ cultive ce micro-organisme sur milieux solides et décrit l'aspect des colonies.

1910 : respectivement BORREL et BORDET découvrent les aspects morphologiques.

1923 : BAIDGE et DONATIEN isolent l'agent responsable de l'agalactie des ovins et des caprins. Ce germe présentant des propriétés bactériologiques comparables à celles décrites pour *Asterococcus mycoïdes* (14).

1929 : NOWACK propose le terme de mycoplasme pour rendre compte de leur aspect pseudomycélien (43).

1935 : Madame KLEINE-BBERGER NOBEL (35) isole au Lister Institut des micro-organismes "parasites" de culture d'un streptobacille dont les colonies présentaient l'aspect des colonies de mycoplasmes. Les parasites étaient des formes de bactéries déficientes dites forme "L" ou PPLO (30).

1936 : LAIDLAW et ELFORD isolent les Acholéplasmes : espèces saprophytes.

1937 : DIENES et ESDALL isolent le premier mycoplasme humain d'un abcès de la glande de Bartholin (23).

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

1942 : SMITH isolait à nouveau ces micro-organismes du col utérin et à partir d'une sécrétion urétrale d'un homme ayant une urétrite non gonococcique et une arthrite (53).

1944 : EATON et ses collaborateurs isolent à partir d'expectorations filtrées de patients présentant une pneumonie atypique primitive un agent qui peut être obtenu en culture sur oeuf de poule embryonné. L'agent responsable fut nommé agent "d'EATON" qui était responsable d'affections respiratoires humaines avec une réponse sérologique spécifique et n'était pas de nature virale (24).

1954 : SHEPARD isole à partir des voies génito-urinaires humaines des mycoplasmes formant des colonies de petite taille les souches "T" (tiny = minuscule) appelées aujourd'hui *Ureaplasma* (51).

1962 : CHANOCK HAYFLICK et BARILE cultivent pour la première fois en milieu acellulaire *Mycoplasma pneumoniae* impliqué dans la pneumonie atypique primitive (20).

1972 : BOVE et ses collaborateurs isolent des mycoplasmes spiralés : les **spiroplasm**es responsables d'une maladie des agrumes le stubborn (6)

1981 : TULLY décrit *Mycoplasma genitalium* isolé d'urétrite non gonococcique mais ses propriétés sont proches de celles de *Mycoplasma pneumoniae* d'autant plus qu'il a récemment été découvert d'un prélèvement respiratoire. Son pouvoir pathogène reste à déterminer (2,30).

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

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

II-TAXONOMIE

Les mycoplasmes sont les plus petits procaryotes capables de se multiplier de façon autonome en milieu acellulaire contenant du sérum, en donnant des structures très polymorphes (6,46).

Ils sont totalement dépourvus de paroi. Ils sont classés dans la division des ténéricutes et dans la classe de Mollicutes (6,25,33,46,54).

Ils existe un seul ordre celui des mycoplasmatales qui est constitué de trois familles (tableau I) :

- Mycoplasmatacae
- Acholeplasmatacae
- Spiroplasmatacae

⊇ Mycoplasmatacae

Cette famille comprend des mycoplasmes pathogènes pour l'homme et les animaux et est divisée en deux genres:

- genre mycoplasma constitué de 69 espèces. Les espèces humaines sont les suivantes :
 - *Mycoplasma pneumoniae* ou agent d'EATON" agent responsable de la pneumopathie atypique primitive avec agglutines froides
 - *Mycoplasma pharyngis* ou orale type 1
 - *Mycoplasma buccale* ou orale type 2
 - *Mycoplasma faucium* ou orale type 3
 - *Mycoplasma salivarum*
 - *Mycoplasma lipophilum*
 - *Mycoplasma fermentans*
 - *Mycoplasma hominis* type 1 et 2
 - *Mycoplasma genitalium*
- genre ureaplasma constitué de 3 espèces dont une seule est pathogène pour l'homme. *Ureaplasma urealyticum*

Cette famille est caractérisée par son exigence en stérols.

⊄ Acholeplasmatacae

Cette famille n'est pas exigeante en stérols. Elle comprend des espèces saprophytes pouvant être pathogènes pour les oiseaux. Elle comprend un seul genre.

⊂ Spiroplasmatacae

- Genre *Spiroplasma* avec trois espèces dont :

Spiroplasma citrii

Deux genres restent non classés

Anaeroplasma : comportant des espèces anaérobies strictes, isolées du tube digestif de certains ruminants exigeant ou non en stérol

Thermoplasma : capable de se multiplier dans des conditions optimales à pH 1-2 à une température de 59°C et non exigeant en stérols.

Tableau I: PROPRIETES DES MYCOPLASMES COMPAREES A CELLES D'AUTRES MICRO-ORGANISMES (42)

	Mycoplasmes	chlamydiae	Autres bactéries	virus
Présence de paroi	-	+	+	-
Passage à travers les filtres (450nm)	+	-	-	+
ADN et ARN	+	+	+	-
Croissance sur milieux acellulaires	+	-	+	-
Nécessité d'une cellule hôte pour la multiplication	-	+	-	+
Besoin en précurseurs d'acide nucléique	+	+	-	+
Besoin d'apport d'énergie	-	+	-	+
Besoin en stérols	+pour la plupart	-	-	-
Croissance inhibée par les anticorps	+	+	-	-
Croissance inhibée par les antibiotiques	+	+	+	-

Tableau II : CLASSIFICATION ET PRINCIPALES PROPRIETES DES MOLLICUTES (6)

Classe	Mollicute					
Ordre	mycoplasmatates					
Familles	mycoplasmatates		acholeplasma	spiroplasma	positions non définies	
Genre	mycoplasma	ureaplasma	acholeplasma	spiroplasma	anaeroplasm a	tillernoplasma
Nombre d'espèces connues	69	3	6	1	2	1
tailleX10 ⁸ d Génome _____ G + C p100	5	5	10	10	NP	10
	_____	_____	_____	_____	_____	_____
	23-41	28	29-35	26	29-34	46
Besoin en cholestérol	+	+	-	+	+/-	-
Localisation NADH oxydase	cytoplasme	ND	membrane	cytoplasme	ND	membrane
Propriétés caractéristiques		activité ureasique		fore hélicoïdale	anaérobie stricte	T°=59°C pH acide 1-2
HABITAT	Animaux homme (1)	Animaux homme (2)	Animaux	Insectes et plantes	Tube digestif des ruminants	charbon de bois, piles usagées

(1) chien, porc, boeuf, chèvre, oiseaux

(2) chien, chat, boeuf, chèvre, singe, rat

ND = Non Déterminé

III- CARACTERISTIQUES DES MYCOPLASMES

3-1-Habitat (Tableau III)

La grande diversité des mycoplasmes fait que ces germes sont ubiquitaires (eau, sol etc.) et de très nombreux végétaux . Les insectes qui jouent le rôle de vecteur et de réservoir peuvent eux-mêmes être atteints d'affection spécifique. Les animaux notamment les animaux en élevage intensif présentent des mycoplasmes qui se traduisent essentiellement par trois sortes de syndromes pulmonaire génital et articulaire (9,27).

Chez l'homme les mycoplasmes ne sont pas tous pathogènes. Certains font parties de la flore microbienne de la cavité buccale ou du tractus urogénital (19).

- *Mycoplasma buccale et faucium* sont retrouvés comme saprophytes dans 1% des cas.
- *Mycoplasma pharyngis* fait partie de la flore normale du rhinopharynx de 50 % des individus comme *Mycoplasma lipophilum* ; mais ce dernier s'y trouve exceptionnellement.
- *Mycoplasma salivarum* est commensal du pharynx chez 30 à 40 % des humains.
- *Mycoplasma fermentans* dont la fréquence d'isolement est particulièrement limitée (5 % des cas) est retrouvé au niveau du tractus urogénital de la femme et de l'homme. Il a été récemment isolé dans le liquide articulaire de malades atteints de polyarthrites rhumatoïdes.
- *Mycoplasma hominis* type 1 :il a été retrouvé comme saprophyte au niveau pharyngé, génito-urinaire mais aussi dans de nombreux produits pathologiques: pus, plaies infectées, sécrétions conjonctivales et respiratoires.
- *Mycoplasma hominis* type 2 : il est exceptionnel et antigéniquement identique à *Mycoplasma cutrii* (mycoplasme animal responsable de polyarthrite chez la souris). Il a été rencontré dans quelques urétrites non gonococcique et lors d'affections génitales chez la femme.
- *Ureaplasma urealyticum* retrouvé au niveau urogénital

Tableau III : LOCALISATION DES MYCOPLASMES HUMAINS (33)

Espèces	Localisation	
	Tractus respiratoire	Tractus urogénital
<i>Mycoplasma salivarum</i>	+	-
<i>Mycoplasma orale</i>	+*	-
<i>Mycoplasma buccale</i>	+*	-
<i>Mycoplasma faucium</i>	+*	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	+*	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+
<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	+*
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	+
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	+*	+

+* espèces rarement isolées

3-2- Morphologie et Structure

3-2-1- Morphologie

Leur taille, le plus souvent inférieure à celle des gros virus 130 nm en moyenne varie de 100 à 300 nm leur permet de passer à travers les filtres de porosité de 450 nm qui retiennent les bactéries et les formes "L" des bactéries. Ils sont entourés d'une membrane plasmique à trois feuillets mais ne possèdent pas de paroi de type bactérien, ce qui les rend totalement insensibles à l'action de bêtalactamines (22).

Ils sont difficiles à observer au microscope photonique même en contraste de phase (34). C'est au microscope électronique que la morphologie a été étudiée.

L'absence de paroi leur permet d'être pléomorphe. il existe des formes filamenteuses longues de 1µm et des formes arrondies de 90nm de diamètre (11).

Les mycoplasmes ne se colorent pas par le Gram mais peuvent être faiblement colorés par le Giemsa. La fixation est délicate et nécessite l'utilisation d'un mélange d'alcool-éther ou de vapeurs d'acide osmique suivie de l'action de l'acide méthylique (46).

L'examen en microscope électronique montre l'existence d'une structure terminale spécialisée chez certaines espèces (*Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*). Il s'agit d'une extrémité effilée ; "le tip" qui joue un rôle important dans l'adhérence des mycoplasmes à différents supports et dans l'orientation du mouvement (6).

3-2-2- Structure

Seuls les caractères morphologiques vus en microscope électronique permettent de faire un diagnostic sur coupe de tissus.

La structure des mycoplasmes consiste à une membrane cytoplasmique à 3 feuilletts d'environ 10nm d'épaisseur, de nombreux ribosomes, un acide désoxyribonucléique (ADN) filamenteux au centre et parfois de corps dense dont on ne connaît pas la nature exacte (11).

L'absence de paroi leur confère

- une grande plasticité
- une grande sensibilité à l'environnement, à la pression osmotique, au pH, aux agents tensioactifs (en particulier les détergents anioniques) et aux variations de température. Ceci a pour conséquence la nécessité de cultiver les germes sur des milieux spéciaux hypertoniques.

- une résistance aux antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi comme les bêtalactamines.

- le passage à travers les filtres de porosité 450nm (42).

La membrane est essentiellement de nature lipoprotéique auxquels s'ajoutent lipopolysaccharides et polysaccharides. Elle contient des esters de cholestérol indispensable à la croissance des mycoplasmes urogénitaux. Ils jouent un rôle régulateur de la fluidité membranaire et qu'ils sont incapables de synthétiser (1,6).

Les mycoplasmes ne possèdent ni acide muramique, ni acide diamino-

pémitique, constituants essentiels de la paroi bactérienne (46).

Malgré l'absence de paroi les mycoplasmes ont une résistance relative à la congélation et aux chocs osmotiques .

3-3- Mode de division

Comme les bactéries, ils peuvent se multiplier sur des milieux acellulaires et produire leur propre énergie mais les mycoplasmes sont beaucoup plus exigeants. Ils ont un besoin absolu en cholestérol (sauf dans le cas du genre *Acholéplasma*) et en précurseurs d'acides nucléiques (purines, pyrimidines, nucléosides) (11).

La multiplication semble bien être une division binaire classique . La courbe de croissance en milieu liquide est identique à celle obtenue pour une bactérie. Le cycle de multiplication de *Mycoplasma pneumoniae* est de 5 à 6 heures (21).

3-4- Type respiratoire

C'est la microaérophilie, voire l'anaérobiose pour la majorité des espèces; cependant certaines telles *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasma hominis* croissent en aérobiose ; une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂ favorisent la croissance (1,30).

3-5- Caractères cultureux

L'examen direct d'un produit pathologique après confection d'un frottis et coloration ne permet pas en microscopie optique de voir les mycoplasmes. Ils sont petits et très peu colorables.

Seule la culture permet de les mettre en évidence, elle est délicate et sa réussite nécessite des milieux complexes et enrichis.

3-5-1- Milieux de culture (11,12)

La plupart des mycoplasmes poussent en milieux artificiels

- le milieu de base est constitué de macération de viande, de protéines animales ou végétales plus ou moins dégradées par digestion enzymatique poussée, de glucose à 0,1 % et de NaCl à 0,5 %.

Pour rendre le milieu solide on y ajoute de la gélose. Cette gélose doit être de

très bonne qualité sans polysaccharides sulfatés qui sont extrêmement toxiques, et inhibent la croissance des mycoplasmes.

Il est indispensable de compléter le milieu bactériologique simple avec deux ingrédients qui rendent leur préparation fastidieuse.

- extrait de levure de bonne qualité. Cet extrait apporte des vitamines et les ions minéraux..
- sérum bien contrôlé qui ne doit pas être toxique pour les mycoplasmes le sérum est non décomplémenté stérilisé par filtration. Il apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié. Ce cholestérol est incorporé dans la membrane des mycoplasmes et leur confère la solidité vis à vis de l'environnement.

Le sérum est aussi très important pour l'incorporation de différents métabolites essentiels en particulier des acides gras.

les mycoplasmes peuvent tous synthétiser leurs propres acides nucléiques mais ont besoin de précurseurs, de pyrimidines, de purines et parfois même des nucléosides.

Afin d'éviter la prolifération de contaminants, on incorpore de la pénicilline. Cependant quelques souches de mycoplasmes sont sensibles à la pénicilline. On a donc trouvé préférable d'utiliser l'ampicilline. D'autres antibiotiques peuvent y être associés: HARWICK conseille le polymyxine B, SHEPARD utilise le mélange VCN à 1 %. L'acétate de thalium peut être incorporé dans les milieux d'isolement de *Mycoplasma pneumoniae*. Il est hautement bactériostatique pour des germes aérobies sporulés et les bactéries Gram (-) mais il est également inhibiteur de la croissance des mycoplasmes T.

Pour empêcher les contaminations par les levures on est tenté d'ajouter de l'amphotéricine B mais il faut savoir que cet antibiotique agit en particulier sur les lipoprotéines de membrane.

En fixant les stérols elle inhibe la croissance de tous les mycoplasmes pathogènes qui sont stérols dépendants.

- Le pH doit être ajusté avec précision au pH optimal favorisant la culture de

tel ou tel mycoplasme.

pH = 6 pour l'isolement des mycoplasmes T

pH = 7,6 et 8 pour *Mycoplasma pneumoniae*

L'incorporation de rouge de phénol dans les milieux liquides permet à tout instant de la culture d'apprécier les modifications de ce pH. L'adjonction de tampon peut améliorer le rendement et la qualité de la culture et favorise la conservation de sa viabilité.

- Le facteur température : étant donné que nous avons à faire pousser des mycoplasmes humains la température de 36-37°C est en général la plus favorable.

- La durée d'incubation entre les passages varie selon les souches. Les mycoplasmes poussent beaucoup plus lentement que les bactéries.

Il n'existe pas un milieu unique satisfaisant la croissance de tous les mycoplasmes. On ne connaît pas toutes les conditions, tous les ingrédients nécessaires à la bonne croissance des mycoplasmes. Pour favoriser l'isolement de mycoplasmes exigeants au sortir de l'organisme on conseille en outre l'adjonction de DNA (20µg/ml) de la cystéine à 0,01 % pour isolement d'ureaplasma des cofacteurs (isovitalex).

3-5-2- Aspect des colonies (42)

a) En milieu liquide

Le développement des mycoplasmes ne provoque aucun trouble mais seulement un virage de l'indicateur de pH lorsqu'il attaque le glucose l'arginine ou l'urée ajoutés aux milieux. Il doit être contrôlé par repiquage en milieu solide.

En cas de culture il apparaît quelques fois des filaments fragiles, des ondes soyeuses, des troubles homogènes très discrets, des dépôts granulaires difficiles à voir.

b) En milieu solide

Les mycoplasmes donnent des colonies caractéristiques de petite taille de 10 à 500µ, peu visible à l'œil nu, leur taille varie en fonction du milieu de l'atmosphère de la culture et des espèces. C'est la taille des colonies qui diffère, la taille des cellules variant peu d'une espèce à une autre.

➤ *Mycoplasma hominis*

Il donne des colonies dites "larges" d'une taille de 10 à 600µ. Elles sont arrondies

granuleuses, homogènes à bord dentelé. Elles sont incolores.

Elles présentent une double auréole évoquant l'aspect "d'œuf sur le plat". En effet un centre opaque s'oppose à une périphérie plus claire, plus étendue l'opacité centrale est due au fait qu'au centre de la colonie les mycoplasmes pénètrent dans la gélose, les formes jeunes restent en surface et forment une auréole semblable au blanc d'œuf.

➤ *Ureaplasma urealyticum*

C'est grâce aux milieux mis au point par SHEPARD qu'il est devenu très facile d'identifier ureaplasma. Le genre ureaplasma est le seul à hydrolyser l'urée. SHEPARD a donc incorporé non seulement de l'urée mais aussi du sulfate de manganèse qui, sous l'effet de l'ammoniac libéré par l'uréase forme de l'oxyde de manganèse qui colore en brun les colonies qui sont alors très faciles à identifier.

En culture sur gélose il forme de petites colonies de 15 à 50 μ d'où leur ancien nom de souches T (tiny). Les colonies peuvent être soit individuelles disséminées à la surface de la gélose, soit individuelles et étalées. Ces colonies individuelles se présentent sous forme d'oursin ou de petits cristaux brun-noirs de taille différente. Très souvent ces colonies sont associées aux cellules épithéliales de muqueuses.

On peut obtenir des colonies de 150 à 200 μ de diamètre grâce à la technique de RANCHE et de TAYLOR ROBINSON (1969). Elles sont à bord irrégulier, parfois multilobé et peuvent émettre plusieurs ramifications.

L'aspect des colonies peut varier à l'intérieur d'une même souche et selon les conditions de culture.

Les colorations de Giemsa et Dienes facilitent leur examen au microscope mais il ne faut pas confondre *Ureaplasma urealyticum* avec des précipités d'uréates.

NB: Etant donné que *Mycoplasma fermentans* et *hominis* (que l'on isole sur les mêmes milieux et à partir des mêmes prélèvements) ne fermentent pas l'urée. Toutes les colonies d'ureaplasma sont brunes tandis que toutes les autres sont des colonies colorées de *Mycoplasma hominis* ou *Mycoplasma fermentans*. Les bactéries qui hydrolysent l'urée ne donnent pas du tout les mêmes images. De plus, les bactéries donnent un trouble dans les bouillons.

Cependant il n'est pas possible de savoir par exemple si l'on a affaire à *Mycoplasma hominis* ou *Mycoplasma fermentans*. Il est alors nécessaire de typer les

souches que l'on isole.

3-6- Caractères biochimiques (21,22,42)

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

Certains caractères biochimiques permettent de différencier les uns et les autres (tableau IV)

Ils possèdent des enzymes nécessaires à leur propre synthèse et peuvent donc se multiplier en l'absence de cellules vivantes. Bien qu'ils soient capables de synthétiser les nucléides, un apport en peptides préformés est indispensable à leur métabolisme.

3-6-1 Métabolisme glucidique

Certaines souches utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie ; certaines sont glucidolytiques d'autres non. Pour les glucidolytiques le produit final de la dégradation est le plus souvent de l'acide lactique pyrolique et acétique en très faible quantité.

Le mannitol, le lactose et le saccharose ne sont jamais fermentés.

3-6-2- Métabolisme lipidique

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

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

Les acides gras nécessaires peuvent être fournis soit liés à la sérum albumine, soit sous forme d'esters solubles dans l'eau.

3-6-3 Métabolisme protidique

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

- arginine : les mycoplasmes excepté *Mycoplasma pneumoniae* et *Ureaplasma urealyticum*, dégradent l'arginine avec production d'ammoniaque. Cette propriété constitue leur source majeure d'énergie et un moyen biochimique d'identification.

- urée : seul ureaplasma possède une uréase et hémolyse l'urée. C'est la propriété la plus caractéristique d'ureaplasma.

3-6-4- Activité hémolytique

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

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

3-6-5- Autres caractères

Les mycoplasmes ne produisent ni indol, ni H₂S, ne possèdent pas de nitrate réductase ni d'oxydase mais possèdent une phosphatase, une NAD hoxydase, aminopeptidase, ATPase, RNase, dNase et des nucléases.

Tableau IV : PROFIL METAPOLIQUE DES MYCOPLASMES (21)

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

3-7- Structure antigénique

La connaissance des antigènes a un triple intérêt :

- identification par inhibition de croissance métabolique
- pour un diagnostic direct par la recherche d'Ag dans les produits pathologiques.

- pour le sérodiagnostic direct or il existe des réactions sérologiques croisées entre les différentes espèces de mycoplasmes (1).

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

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

D'autre part l'importance d'utiliser des immuno-absorbants pour éliminer les traces de milieux de cultures absorbées sur les mycoplasmes et qui aboutit à une chute du titre d'immuno-sérum (37).

Sa composition antigénique est très mal connue. Les immunogènes des mycoplasmes sont des Ag de surface localisés sur la membrane cytoplasmique. Ils sont pour la plupart thermolabiles et sensibles aux enzymes protéolytiques.

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

Dans les infections, la présence d'Ac spécifique est rare et leur titre peu élevé maximum 1/8 d'où leur peu d'utilisation du point de vue diagnostic (22).

Un mycoplasme possède plusieurs constituants antigéniques dont certains sont spécifiques :

Pour *Mycoplasma hominis* et *Mycoplasma fermentans* des Ag de membrane sont des glycolipides. Le carbohydrate donnant la spécificité à l'haptène (42).

Actuellement 14 sérotypes sont connus pour *Ureaplasma urealyticum* et 7 pour *Mycoplasma hominis*. Des études tendent à montrer que certains sérotypes

seraient plus pathogènes que d'autres et seraient reliés à une certaine pathologie. Le sérotype N°4 de *Ureaplasma urealyticum* a été rencontré lors d'urethrites gonococciennes masculines et les sérotypes N°3, 6, 11, 13 ont été retrouvés lors d'avortement (2,19,28).

Le problème reste posé. certains sérotypes sont-ils plus pathogènes que d'autres; ou est ce que l'association des mycoplasmes à d'autres organismes ou la modification des défenses locales ou de l'environnement qui rendent ces sérotypes plus nocifs ou qui modifient la virulence des souches ? (1,28)

3-8- Génétique

Le génome des mycoplasmes est un ADN circulaire à double brin. Par sa taille (5.10^8 à 10^9 daltons) il est le plus petit des génomes de cellules procaryotes.

La composition en paires de bases de l'ADN est de 23 à 41 molles de G+C% pour mycoplasma et 27 à 30% 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.

Différents types de transferts génétiques ont pu être effectués chez les mycoplasmes : transformation, conjugaison et transfection (6).

3-9- Sensibilité aux agents physicochimiques/résistance /conservation (42)

L'absence de paroi les rend fragile. Ils sont :

- très sensibles aux ultra-sons
- sensibles aux antiseptiques usuels, aux agents tensioactifs à la chaleur aux acides , aux rayons UV, à la putréfaction, aux variations de pH.

Ils ont une survie très limitée dans le milieu en dehors du saprophytisme.

Ils sont sensibles aux chocs osmotiques et présentent une résistance relative aux cycles de congélation décongélation.

Les mycoplasmes sont résistants au tellurite de potassium, au cristal violet, au vert brillant, à la fushine basique, au bleu de méthylène...

Ils résistent également à l'acétate de thallium excepté *Ureaplasma urealyticum* dont il inhibe la croissance.

Le 5 iododesoxyuridine inhibe la croissance d'ureaplasma et c'est le seul mycoplasme à subir l'action d'un inhibiteur de virus à ARN.

Au laboratoire ils se conservent après lyophilisation ou simple congélation à condition qu'ils soient incorporés dans un milieu protéique tamponné et que la culture soit pure.

IV- EPIDEMIOLOGIE

Les aspects épidémiologiques actuels sont importants à connaître car ils vont commander les modalités thérapeutiques

4-1- chez le nouveau né

Mycoplasma hominis mais surtout *Ureaplasma urealyticum* contaminent fréquemment l'enfant à la naissance. Les germes sont isolés des voies génito - urinaires de 10 à 20 % des fillettes et de 3 à 5% des garçons. La colonisation se produit lors de l'accouchement au moment du passage dans les voies génitales, elle est donc moins fréquente quand l'enfant naît par césarienne. Cette colonisation est transitoire, elle disparaît quelques mois après la naissance avec toutefois une persistance un peu plus longue chez la fillette (3,28,30).

4-2- chez l'adolescent à la puberté

C'est à partir de ce moment de la vie que les mycoplasmes réapparaissent au niveau des voies génitales ; les échanges par contacts sexuels augmentent la fréquence des sujets colonisés (1).

4-3- Chez l'adulte

a) 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.

Mycoplasma hominis et *Ureaplasma urealyticum* sont parfois rencontrés au niveau de l'oropharynx et chez les homosexuels (1).

b) Fréquence d'isolement

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

Ureaplasma urealyticum fait partie de la flore génito urinaire dans 40 à 70% des cas, mais prédomine chez la femme. Cependant, il peut parfois , être isolé chez 60% des hommes et 80% des femmes issues d'une population à risque suivie ou consultation de MST (8, 28, 37).

c) Paramètres influençant la présence des mycoplasmes chez l'adulte

- le nombre de partenaires

Une étude réalisée par TAYLOR-ROBINSON rapporte la fréquence des mycoplasmes en fonction du nombre de partenaires sexuels des individus.

TABLEAU V : FREQUENCE DES MYCOPLASMES EN FONCTION DU NOMBRE DE PARTENAIRES SEXUELS DES INDIVIDUS (32)

Fréquence d'isolement	1 partenaire	3 partenaires ou plus
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	19%	45%
<i>Mycoplasma hominis</i>	0%	14%

CHEZ L'HOMME

Fréquence d'isolement	1 partenaire	3 partenaires ou plus
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	38%	75%
<i>Mycoplasma hominis</i>	9%	17%

CHEZ LA FEMME

La fréquence d'isolement de ces germes augmente avec le nombre de partenaires sexuels. La femme est plus sensible que l'homme au portage. Mc

COMMACK avait aussi montré que la colonisation des muqueuses génitales par les mycoplasmes augmente avec l'activité sexuelle de leur hôte. BEBEAR et LATRILLE ont mis ceci en évidence chez des prostituées (1,8,31).

- le niveau socio économique

La colonisation est plus fréquente chez une population défavorisée que chez une population plus aisée (9).

- la race (1)

- l'état hormonal

Les mycoplasmes sont plus fréquemment rencontrés chez la femme dans la deuxième partie du cycle menstruel et pendant la grossesse (13).

- le pH du vagin (13)

- l'âge

- la contraception (1)

Les études à ce sujet sont encore contradictoires

- les infections vaginales

Les femmes souffrant d'infection bactériennes ou de vaginites à *Trichomonas* voient les mycoplasmes proliférer en concentration élevée. Dans ce cas le risque de surinfections à mycoplasmes est multiplié par un facteur 3 à 10. (28)

V. POUVOIR PATHOGENE

Le pouvoir pathogène des mycoplasmes est loin d'être clairement défini. Leur rôle en pathologie infectieuse, certain pour *Mycoplasma pneumoniae*, est très recherché dans d'autres domaines, mais reste encore l'objet de beaucoup d'incertitudes.

L'attention a été attirée dès 1937, sur le rôle éventuel des mycoplasmes en pathologie génitale, avec l'isolement par DIENES de la première souche humaine *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* (ancienne souche T) sont les espèces les plus couramment retrouvées dans ce domaine. Leur place a depuis lors été recherchée dans des affections diverses de la sphère urogénitale : infection urogénitale de l'homme ou de la femme, certains cas de stérilité ou d'avortements spontanés, hypotrophie du nouveau-né, etc. (5)

5-1- Pathogénie

Les mycoplasmes parasites extracellulaires possèdent différents mécanismes leur permettant d'exercer leur pouvoir pathogène. Ces mécanismes sont surtout connus dans le cas d'*Ureaplasma urealyticum* (50). Des propriétés d'adhésion aux cellules ont été décrites chez certains sérotypes (il en existe au moins 14 différents), adhésion aux cellules héla, aux spermatozoïdes. En outre, *Ureaplasma urealyticum* possède des activités enzymatiques variées susceptibles d'intervenir dans son pouvoir pathogène ; une uréase très puissante, une IgA protéase supposée être un facteur de virulence pouvant dégrader les IgA présentes sur les surfaces muqueuses et une phospholipase capable de léser les membranes cellulaires.

5-2- Mycoplasmes et infections du tractus génital 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 *Mycoplasma 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 (UNG), il fait l'objet de controverses dans d'autres atteintes telles que prostatiques et épидидymites.

5-2-1- Urétrite non gonococcique

On qualifie d'urétrite non gonococcique des maladies ayant en commun le pouvoir d'entraîner des signes fonctionnels et biologiques (polynucléaire dans l'exudat) en l'absence de *Neisseria gonorrhoea* recherché par culture adéquate. Les urétrites non gonococciques constituent actuellement la première cause des Maladies Sexuellement Transmissibles(MST)(7,16,39)

Ureaplasma urealyticum est à côté de *Chlamydia trachomatis*, un des agents causal de ce type d'infection.

- L'urétrite aiguë est impossible à différencier de l'urétrite aiguë gonococcique.

En général dans ce type d'urétrite, la période d'incubation est courte.

La sécrétion urétrale est importante et on a même décrit des formes hémorragiques douloureuses.

- L'urétrite subaiguë (type urétrite de WAELSCH) est la plus importante ; la période d'incubation est forte et variable (10 à 60 jours). Les urines sont en général claires avec parfois un ou plusieurs filaments. A l'urétroscopie, on découvre une muqueuse souvent rougeâtre, enflammée avec même parfois dans les formes un œdème du col vésical.

Les résultats observés par différents auteurs varient beaucoup d'une enquête à l'autre. Ford et Benett(5) ont ainsi isolé *Ureaplasma urealyticum* chez 60 à 70% de sujets atteints d'urétrite non gonococcique contre 17 à 20% des sujets indemnes d'infections génito-urinaires. Pour Black et Rasmussen, les résultats sont beaucoup plus variables et dépendent des groupes d'individus observés. *Ureaplasma urealyticum* est retrouvé chez 46% des sujets atteints d'urétrite non gonococcique contre des taux variant de 25 à 34% selon les groupes témoins d'étude(1,5)

Le rôle des mycoplasmes génitaux dans les complications des urétrites, des arthrites réactionnelles et le syndrome de Reiter n'est pas confirmé dans l'état actuel des méthodes de diagnostic(2).

Comme *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* peut faire partie de la flore commensale d'un individu. Il ne suffit pas d'isoler des ureaplasma à partir d'un prélèvement urétral pour leur attribuer une urétrite. Il convient d'en apprécier le nombre, leur pouvoir pathogène étant, d'autant plus probable qu'ils sont plus nombreux, et de rechercher d'autres agents(1).

5-2-2- Prostatite aiguë et chronique

Il était logique de supposer que *Ureaplasma urealyticum* agent d'urétrite non gonococcique pouvait provoquer des prostatites. Pour en faire la preuve WEIDNE et collaborateurs ont utilisé des techniques de fractionnement des prélèvements (techniques des 4 échantillons) (15, 55). Ils ont pour cela quantifié les ureaplasma

dans les urines obtenues après massage prostatique. Il ne paraît pas cependant intervenir dans les prostatites aiguës, il jouerait un rôle d'entretien dans les prostatites chroniques dans environ 15% de cas.

5-2-3- Epididymite

Les épидidymites peuvent être dues à *Chlamydia trachomatis* ou à des bactéries pathogènes du tractus urinaire. Le rôle de *Ureaplasma urealyticum* est controversé ; les études récentes suggèrent qu'il peut intervenir mais probablement de façon ponctuelle. Néanmoins comme pour les prostatites la preuve est difficile à apporter (32).

5-3- Mycoplasme et infections gynécologiques

Chez la femme, l'infection est asymptomatique et la colonisation du tractus génital sera ascendante vers l'endomètre, les trompes de fallopes, l'ovaire, le péritoine (30).

Près de 60% des femme saines porteuses au niveau du vagin d'*Ureaplasma urealyticum* et 20% de *Mycoplasma hominis*.

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

5-3-1- Vaginites et cervitites (2)

Mycoplasma hominis est fréquemment isolé à partir de vaginite non spécifique. sa présence est-elle la cause ou la conséquence d'un tel syndrome. Il intervient probablement en association avec d'autres agents (*Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, trichomonas et diverses anaérobies).

L'épreuve thérapeutique ne permet pas de lui attribuer un rôle prépondérant. Il jouerait un rôle en symbiose avec les autres pathogènes.

Les mycoplasmes ne semblent pas jouer un rôle important dans la survenue des cervitites.

5-3-2- Endométrites, salpingites, inflammations pelviennes

Mycoplasma hominis a été isolé d'assez nombreuses reprises par hémoculture

lors de poussées fébriles post partum et post abortum.

Mycoplasma hominis provoquerait des poussées fébriles généralement modérées par l'intermédiaire d'une endométrite (2).

Des études sérologiques ont montré que *Mycoplasma hominis* pouvait être associé à des salpingites (40).

5-4- Mycoplasmes et troubles de la reproduction

5-4-1-° Stérilité

Les mycoplasmes adhèrent facilement aux membranes cellulaires. Leur action décrite sur les spermatozoïdes est donc possible. FOWLKES a en effet montré que dans le sperme contenant des ureaplasma, des spermatozoïdes généralement en nombres réduits avaient une mobilité réduite et présentaient de nombreuses formes anormales. Ces anomalies disparaissent après éradication des ureaplasmas par une thérapeutique antibiotique appropriée (25).

5-4-2- Pathologie 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 de tissus prélevés par césarienne ou amniocentèse (17)

Les mycoplasmes spécialement *Ureaplasma urealyticum* ont été mis en cause dans des tableaux cliniques variés, avortement spontané à répétition, prématuré, chorioamniotique. c'est ainsi que *Ureaplasma urealyticum* a été isolé plus fréquemment à partir de prélèvement d'endométrie chez des patients présentant des avortements spontanés à répétition (28%) que sur un groupe témoin (7%) (2).

5-5- Atteintes néonatales

Deux catégories de tableaux cliniques sont envisagés.

- hypotrophie néonatale
- infections respiratoires ou méningées chez les nouveaux-nés

hypotrophiques. Des études statistiques ont montré que les nouveaux-nés colonisés par *Ureaplasma urealyticum* au niveau de leurs voies aériennes avaient un poids moyen de naissance plus faible (2,605 kg) que ceux non colonisés (2,952 kg).

Récemment *Ureaplasma urealyticum* a été trouvé responsable d'infections respiratoires chez des nouveaux nés à risque. L'étude bactériologique d'aspiration endotracheale chez des nouveaux nés hypotrophiques présentant des infections respiratoires a montré que *ureaplasma urealyticum* était le micro organisme le plus souvent incriminé. Il s'agissait d'une infection acquise in vitro puisque dans un nombre important de cas, des enfants étaient nés par césarienne. Les autres concluaient à une infection véritable des voies respiratoires basses par *Ureaplasma urealyticum* puisqu'il était observé en culture pure en quantité élevée de 85% des cas. *Ureaplasma* et *Mycoplasma hominis* ont également été isolés chez les nouveaux nés prématurés très hypotrophiques à partir de LCR(18).

5-6- Mycoplasmes et SIDA la notion de cofacteur(44)

Les récents travaux des équipes de L. Montagnier (Institut Pasteur Paris) et SC LO (USA), outre leur intérêt ont permis de réactualiser l'importance des cofacteurs et des écosystèmes, dans les processus physiopathologiques 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 avec les mycoplasmes incognitus fermentans et pirum et certaines homologues peptidiques entre mycoplasmes CD4, protéine classe II, et même d'autres agents infectieux (CMV, HSV) suspectés d'être également des cofacteurs du VIH conduisent maintenant à considérer deux hypothèses :

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

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

De nombreux travaux sont en cours dans ces voies de recherche.

5-7- Mycoplasmes et Cancer(44)

Certains auteurs pensent à une intervention de divers agents bactériens comme les mycoplasmes dans la genèse des cancers du col.

Il faut néanmoins rester très prudent sur le rôle pathogène des mycoplasmes dans ces affections. On peut simplement avancer certaines hypothèses comme celle découlant des relations directes entre les membranes des mycoplasmes et celle des cellules eucaryotes : ces relations modifieraient le comportement d'une cellule par l'intermédiaire ou non d'un signal.

5-8- Infections diverses

- lithiase

Mycoplasma hominis a été mis en cause dans quelques cas de polyonéphrites aiguës sur deux arguments.

- isolement du mycoplasme à partir des voies urinaires hautes.

- détection d'anticorps spécifiques dans le sérum et surtout dans les urines.

Ureaplasma urealyticum a été incriminé comme agent responsable de lithiases phosphoammoniacomagnésiennes

VI- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le diagnostic d'une atteinte infectieuse par *Mycoplasma hominis* ou *Ureaplasma urealyticum* est délicat à cause de la présence chez l'homme de ces germes à l'état saprophyte au niveau du tractus génito-urinaire(4,5).

Le diagnostic repose essentiellement sur la mise en évidence du micro-organisme.

6-1- Diagnostic direct

6-1-1- Prélèvements

Les mycoplasmes ont une affinité très grande pour les membranes des cellules muqueuses. Il sera important dans les tous cas de recueillir le plus grand nombre de cellules possible. Ils seront effectués avant tout traitement antibiotique(1).

a) Chez l'homme

Le prélèvement est effectué au niveau de l'urètre soit à partir d'un écoulement soit par écouvillonnage ou grattage avec une minuscule curette. On peut également recueillir le sperme qui doit être immédiatement dilué au 1/10è dans le milieu de culture pour éviter l'effet toxique des protéases.

b) Chez la femme

On fait un écouvillonnage vaginal ou endo cervical ou prélèvement des sécrétions au niveau du col et des culs de sacs éventuellement au niveau des glandes de SKENE et de BARTHOLIN.

c) Autres prélèvements

Les liquides biologiques doivent être centrifugés et le culot inoculé les tissus ne doivent pas être broyés mais découpés.

LCR et le sang sont rarement ensemencés.

6-1-2- Transport et conservation

Le meilleur pour recueillir le prélèvement est certainement le milieu de culture lui même malheureusement il n'est pas toujours possible de cultiver les mycoplasmes immédiatement. On utilise un milieu de transport. Ce milieu est à pH acide contenant

du sérum de poulain et de l'extrait de levure (milieu A3) l'écouvillon est déchargé dans ce milieu qui sera maintenu à 4°C si l'ensemencement est différé. La congélation à -70°C apparaît comme un excellent procédé de conservation(1,6,45).

6-1-3- Isolement et identification

Mycoplasma hominis et *Ureaplasma urealyticum* étant les mycoplasmes les plus souvent observés dans la sphère urogénitale. Deux catégories de milieux ont été utilisés

- les milieux pour mycoplasma sont des milieux liquides ou gélosés dérivant du milieu de HAYFLICK

- les milieux pour ureaplasma liquides ou gélosés dérivant du milieu de SHEPARD

- les milieux d'identification contiennent des sérum de l'extrait de levure un indicateur coloré (rouge de phénol) et un des substrats d'identification (urée, arginine, glucose)

- les milieux solides contiennent du sérum, extrait de levure, des substrats énergétiques et un agent sélectif.

Les divers produits ont été ensemencés sur les trois milieux liquides (bouillon urée, bouillon arginine, bouillon glucosé) et sur milieu solide l'incubation se fait à 37°C en atmosphère microaerophilie.

La lecture des milieux se fait au maximum à la 48^e heure .

L'identification repose sur deux critères essentiels :

- l'aspect des colonies en milieu solides

- la réaction métabolique

- sur milieux solides les colonies de *Ureaplasma urealyticum* sont brunes en oursin avec 10 à 50µ de diamètre, les colonies de *Mycoplasma hominis* et de *Mycoplasma fermentans* sont en "oeuf sur le plat" de 100 à 300µ de diamètre et les colonies de *Mycoplasma genitalum* sont sphériques.

- > les réactions métaboliques sont basées essentiellement sur le métabolisme des trois substrats qui sont ajoutés aux milieux de culture liquide, en présence de rouge de phénol.

- glucose : il est métabolisé avec formation d'acides d'où virages du jaune au rouge (diminution du pH)

- l'arginine dont le métabolisme libère de l'ammoniac de l'ATP et du CO₂, NH₃ alcalinise le milieu et produit le virage du milieu

- l'urée qui est hydrolysé par *Ureaplasma urealyticum* avec libération de NH₃ et CO₂ et alcalinisation donc virage au rose lilas.

NB : les mycoplasmes ne provoquent jamais de trouble de bouillon ou très rarement dans le cas des souches bien entraînées.

Le titrage sur milieux liquides se fait par des dilutions successives au 1/10 et le titre correspond à l'inverse de la dernière dilution positive exprimée en UCC/ml (unité changeant de coloration /ml) sur milieu solide, le titre est donné par la correspondance entre le nombre de colonies par champ et le nombre de UFC (unité formant colonie)

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 sur milieu liquide (49,50).

6-2- Diagnostic sérologique(51)

La sérologie des mycoplasmes urogénitaux ne pourra jamais être utilisée à des fins de diagnostic d'une infection locale mais elle permettra uniquement d'effectuer un diagnostic différentiel entre une infection profonde (salpingite, septicémie du post abortum et du post partum, endométrite, prostatite, pyélonéphrite) et une infection basse à mycoplasme (taux suprapathogène 10⁴UCC/ml avec une sérologie négative).

Plusieurs techniques sont utilisées :

- inhibition du métabolisme : elle consiste à étudier l'effet d'un sérum dilué en série sur l'activité métabolique des mycoplasmes.

- Elisa plus sensible mais peut être moins spécifique. Cette réaction est sous la dépendance de l'Ag choisi qui ne croise pas forcément avec le sérotype responsable de l'infection.
- technique de microimmunofluorescence. Elle présente la spécificité de l'inhibition du métabolisme et la sensibilité de l'Elisa.
- Western blot : il permet de visualiser un certain nombre de réactions croisées et les protéines spécifiques de chaque mycoplasme.

TABLEAU VII: Tableau récapitulatif interprétation des Résultats (Diagnostic Pasteur) (42)

		<i>U. urealyticus</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. genitalium</i>
Bouillon urée	Réaction négative: jaune paille	+++	-	-	-
	Réaction positive rouge				
Bouillon arginine	Réaction négative orange	-	+++	++	-
	Réaction positive rouge				
Bouillon glucosé	Réaction négative rouge	-	-	++++	+
	Réaction positive jaune				
Aspect des colonies sur gélose		colonies brunes en oursin de 10 à 50µm	colonies en œuf sur le plat de 100 à 300µm	colonies en œuf sur le plat de 100 à 300µm	colonies sphériques de 100 à 300µm

Tableau VIII : dénombrement des Mycoplasmes sur milieux solides

Nombre de colonies	Titre du prélèvement /ml de milieu
---------------------------	---

<1 colonie	10 ³ UFC
1 à 5	10 ⁴ UFC
5 à 15	10 ⁵ UFC
>15	10 ⁶ UFC

VII- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES (2, 30, 42, 47)

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

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

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

La réaction utilisée est une inhibition du métabolisme qui est révélée par l'absence du changement de couleur du milieu qui contient un indicateur de pH : le rouge de phénol.

Les mycoplasmes sont des bactéries sans paroi. Par conséquent tous les antibiotiques (AB) dont le mécanisme d'action consiste à inhiber la biosynthèse des constituants de la paroi bactérienne et qui sont à priori inactifs sur les mycoplasmes sont à placer dans ce groupe : les Bétalactamines, Bacitracine, Vancomycine et la Phosphomycine.

Tétracyclines et macrolides sont les antibiotiques habituellement utilisés dans le traitement des infections à mycoplasmes. Cependant la sensibilité des mycoplasmes génitaux *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* à ces antibiotiques est variable. Entre 5 à 10% des souches d'*Ureaplasma urealyticum* ainsi qu'un pourcentage non défini de souches de *Mycoplasma hominis* hébergent le gène résistance "tet M" et résistent aux tétracyclines. Cette résistance est susceptible

d'être à l'origine d'échecs thérapeutiques.

D'autres résistances sont connues polymixines : Rifamycine, Sulfamides, Triméthoprine, quinolones de première génération (proposés dans le traitement des MST ont une activité inconstante). 5 nitro imidazole et nitrofurane sont peu actifs ou totalement inactifs sur les mycoplasmes génitaux.

Mycoplasma hominis est résistant à l'érythromycine alors que *Ureaplasma urealyticum* y est sensible.

Ureaplasma urealyticum est résistant à la lincomycine et *Mycoplasma hominis* y est sensible. Selon des études menées dans plusieurs pays le pourcentage des souches résistantes à la tétracycline est supérieure à 10% et en constante progression sur ces 10 dernières années. Cette résistance pourrait être à l'origine de fréquentes récurrences.

Les CMI et les pourcentages de souches résistantes relevés dans la littérature sont extrêmement variable. Ces discordances sont essentiellement dues aux différentes conditions opératoires : les mycoplasmes sont des germes exigeants, la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques ne peut pas être réalisée dans des conditions standards et chacun emploie une méthode et des conditions complexes et particulières. De plus tous les auteurs ne s'accordent pas sur la définition de la sensibilité et de la résistance.

A défaut d'une standardisation, la mention précise de la composition du milieu, du pH, de la teneur en sérum, de l'atmosphère et de la durée de l'incubation, de la taille de l'inoculum est indispensable. La valeur absolue des CMI doit être relativisée par l'essai en parallèle d'une souche de référence dans les conditions standards et dans les conditions de culture des mycoplasmes : l'influence des différents facteurs physicochimiques sur l'activité in vitro des antibiotiques peut être évaluée. Enfin la notion de souches résistantes doit être ainsi objectivée par l'indication des CMI considérées comme critiques.

Le mécanisme de la résistance acquise des mycoplasmes aux tétracyclines est lié à l'acquisition du gène "M" qui code pour une résistance croisée à la tétra, doxy

et minocycline. Il existe une résistance aux macrolides en particulier pour *Mycoplasma hominis* mais la Josamycine et Rokitamycine sont régulièrement actives.

La Pristinamycine est très active et présente l'intérêt d'être active sur *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

Les fluoroquinones comme Ofloxacine sont une bonne alternative de traitement du fait des résistances aux tétracyclines et de la sensibilité variable aux macrolides.

En définitive les mycoplasmes urogénitaux sont constamment résistants aux bêtalactamines à la Vancomycine, la Bacitracine, les Polymyxines, les Sulfamides, le Triméthoprine, les quinolones, les 5 nitro imidazole et peu ou pas sensibles au 6 nitro furantoine. Les aminosides sont modérément actifs. Le chloramphénicol régulièrement actif, a peu d'indication dans les infections à mycoplasmes.

Mycoplasma hominis est résistant aux macrolides vrais anciens (erythromycine, spiramycine, deandromycine). Sensible aux autres MLS, il est résistant à l'erythromycine alors que cet antibiotique est très actif sur ureaplasma.

Ureaplasma urealyticum est résistant aux lincobamines, sensibles aux autres MLS et aux tétracycline. 2 à 10% des souches résistantes aux macrolides sont probablement rares. D'une façon générale on utilise les tétracyclines si ureaplasma est isolé on peut employer l'erythromycine.

MATERIELS ET METHODES

I- ISOLEMENT IDENTIFICATION

Le but de ce travail est la mise au point de techniques de préparation des milieux pour l'isolement et l'identification des mycoplasmes urogénitaux en microméthodes.

1-1-° Préparation des milieux

1-1-1 Matériel

- agitateur magnétique
- balance de précision
- pHmètre
- seringues
- filtres de 0,2 µm de diamètre
- micropipettes
- embouts stériles
- flacon en verre avec bouchon à vis de 5, 100 et 150ml
- tubes stériles de 2,5 et 5ml
- erlen meyer
- papier emballage
- a) Réactifs
- sérum de poulain non inactivé
- sérum de cheval
- bouillon trypticase soja
- extrait de levure en poudre
- L-cystéine
- pénicilline 500 000 et 1 million U
- ampicilline
- peptone de soja
- chlorure de sodium
- rouge de phénol
- L. arginine
- glucose

- urée

1-1-2- Méthode

Chaque milieu complet est constitué d'un milieu de base et d'un supplément. Certains constituants du supplément étaient fixés alors que d'autres sont testés à des concentrations variées afin de voir leur effet sur la vitesse de la croissance des mycoplasmes.

Une fois préparés, les milieux sont testés sur un grand nombre de prélèvements afin de fixer les éléments variables pour obtenir une composition finale avant l'évaluation.

Les différents éléments variables sont les suivants :

- l'extrait de levure avec trois solutions à 0,3% - 0,4% - 0,5%
- la pénicilline G avec deux solutions à 500 000µ/ml et l'autre o 1 millionµ/ml
- l'ampicilline à 1mg/ml
- le rouge de phénol avec trois solutions à 3% - 4% - 5%
- l'urée avec deux solutions à 5% et 10%
- l'arginine avec deux solutions à 20% et 25%

a) Milieu de transport et de conservation

Milieu de base :

Bouillon hypticase - soja	30 g
Eau distillée qsp	1000 ml

La poudre est dissoute à chaud ; le pH ajusté à 5,5. Le milieu est ensuite réparti dans des flacons sous un volume de 80ml et autoclavé pendant 20 minutes à 120°C

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
pénicilline G (ou 100mg d'ampicilline)	1 ml

Ce mélange est homogénéisé et stérilisé par filtration.

Ce milieu est réparti dans des tubes à vis sous un volume de 2 ml et peut être conservé à 4°C pendant trois semaines ou à -20°C pendant un an.

b) Milieux d'isolement et d'identification bouillon urée

Milieu de base :

Bouillon hypticase soja	30g
Eau distillée qsp	1000ml

La poudre est dissoute à chaud ; le pH ajusté à 5,5. Le milieu ainsi obtenu est réparti dans les tubes sous un volume de 95 ml et autoclavé pendant 20 minutes à 120°C.

Milieu complet :

milieu de base	95 ml
sérum de poulain	5 ml
extrait de levure	2 ml
urée	1 ml
L-cystéine à 4%	0,25 ml
pénicilline G (ou 100 mg d'ampicilline)	0,1 ml
rouge de phénol	0,1 ml

Ce mélange est homogénéisé et stérilisé par filtration.

Le mélange ainsi constitué est réparti dans des tubes sous un volume de 15 ml et peut être conservé à 4°C pendant trois semaines ou à -20°C pendant 1 an.

Bouillon arginine :

Milieu de base :

peptone de soja	20 g
chlorure de sodium	5 g
eau distillée	1 000 ml

Le mélange est homogénéisé et par la suite autoclavé pendant 15 minutes à 121°C. Il est réparti dans un volume de 65 ml et peut se conserver à la température ambiante pendant plusieurs mois.

Milieu complet :

milieu de base	65 ml	
sérum de cheval	20 ml	
extrait de levure	10 ml	
pénicilline G (ou 100 mg d'ampicilline)		1 ml
L-arginine	2 ml	
rouge de phénol	0,1 ml	

Ce mélange est homogénéisé et stérilisé par filtration.

Le pH final est ajusté à 6,1. Le bouillon obtenu est réparti sous un volume de 10 ml dans des tubes et peut se conserver à 4°C pendant 1 an.

Bouillon glucosé :

Le bouillon glucosé est préparé de la même manière que le bouillon arginine à l'exception de l'arginine qui est remplacée par la solution molaire de glucose.

1-2- Isolement et identification

1-2-1 Matériel

- microplaques
- micropipettes
- embouts stériles
- film adhésif

a) Réactif

milieu de transport et de conservation
bouillon urée
bouillon arginine
bouillon glucosé
kit commercial par contrôle de qualité

1-2-2 Méthodes

a) Recueil et traitement des prélèvements

L'échantillonnage est constitué de prélèvements urogénitaux

- prélèvements d'endocol
- prélèvements urétraux
- prélèvements de sperme
- prélèvements d'urines

Ces prélèvements sont recueillis chez des patients venant en consultation au Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hopital Aristide Le Dantec (HALD) et d'autres laboratoires(Principal et IHS).

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

Pour les prélèvements liquides :

le sperme et le premier jet d'urine sont homogénéisés

l'urine mictionnelle est centrifugée et le culot de centrifugation est repris par 0,2 ml d'eau physiologique, 0,2 ml d'échantillon est inoculé dans le milieu de transport.

b) Ensemencement

La microplaque utilisée dispose de 20 puits. Chaque prélèvement est inoculé dans 5 puits dont 2 pour le bouillon urée, 2 pour le bouillon arginine et 1 pour le bouillon glucosé.

Les bouillons sont distribués à l'aide d'une micropipette à raison de 180 µl par puits.

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

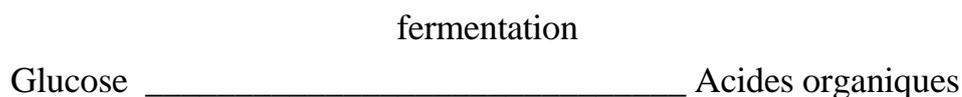
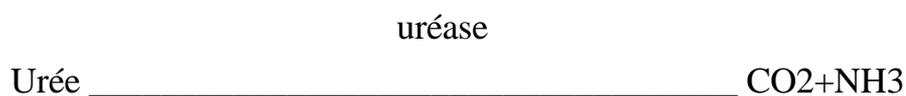
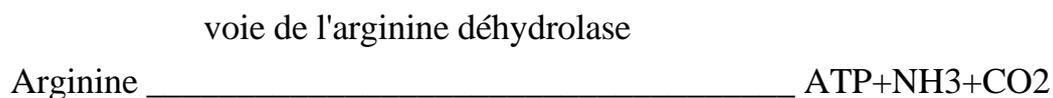
Les microplaques sont ensuite recouvertes d'un film adhésif et incubées à 37°C sur un support humide (papier buvard imbibé d'eau) pour éviter la déshydratation du contenu des puits.

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

c) Identification

Principe :

Sur milieu liquide, le principe est basé sur le métabolisme du substrat présent dans le bouillon (urée, arginine et glucose), lequel métabolisme est détecté par le virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).



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

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

Chaque espèce est identifiée en fonction de sa capacité de métaboliser le substrat.

La croissance des mycoplasmes ne s'accompagne jamais du trouble du milieu qui traduit 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.

d) Titrage

Principe :

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

Méthode :

Le premier jour, chaque prélèvement est ensemencé jusqu'à la dilution 10^{-2} (sur la plaque) 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 est ensemencé à des dilutions allant de 10^{-3} à 10^{-9} pour déterminer la dilution finale qui correspond au dernier puits positif. Le titre final est calculé de la manière suivante :

- pour les prélèvements effectués par écouvillonnage, l'écouvillon chargé d'environ 20µl de sécrétions était déchargé dans 2 ml de milieu de transport soit une dilution au 1/100.

- pour le sperme et le premier jet d'urines, les prélèvements sont 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 culot de centrifugation de 5ml est repris par 0,2ml d'eau physiologique puis inoculé dans le milieu de transport, la dilution finale est égale à la dernière dilution positive multipliée par 10^{-1}

- le titre donné en UCC/ml est obtenu par l'inverse de la dilution finale.

- pour les urines mictionnelles, le titre est obtenu par l'inverse de la dilution finale divisé par 5.

e) Viabilité des germes dans le milieu de transport

Pour évaluer la sensibilité des germes dans le milieu de transport, des comparaisons sont faites entre les plaques inoculées avec le milieu de transport le jour du prélèvement, le deuxième jour conservé à 4°C, le deuxième jour après une

incubation à 37°C toute la nuit, le troisième jour à 4°C et pendant une semaine.

f) Stabilité des résultats de la lecture à l'étuve

Elle permet de vérifier si les résultats de la lecture peuvent changer 24 heures ou 48 heures après la dernière lecture finale les plaques sont abandonnées soit à l'étuve soit sur la paillasse pour observer l'éventuel changement à la 24ème et la 48ème heure après la lecture finale.

1-3- Evaluation

1-3-1 Matériel

Le matériel utilisé pour la culture est le même que celui du chapitre isolement et identification.

Kit Commercialisé : Mycoplasma DUO

Mycoplasma origenicus

L'échantillonnage est constitué de 179 prélèvements dont :

Prélèvements d'endocol : 125

Prélèvements urétraux : 13

Prélèvements de sperme : 3

Prélèvements d'urine : 38

1-3-2 Méthodes

Les méthodes de culture d'isolement d'identification sont les mêmes que celles décrites précédemment.

a) Mise au point et validation

Lorsqu'un lot de milieux était préparé , il était nécessaire de s'assurer de la stérilité, de l'efficacité, de la stabilité et de la répétabilité

->Stérilité

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

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

->Efficacité

Le milieu considéré comme stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif avec souche dont le caractère correspondant est positif et à donner un résultat négatif si ce caractère est négatif pour une autre souche donnée

Nous avons choisi des souches au hasard(à l'IHS) dont le profil a été déterminé et que nous avons retesté avec nos milieux mis au point. Le profil des deux milieux (Mycoplasma DUO utilisé à l'IHS et le milieu mis au point) pour les souches choisies était identique

- -TMStabilité

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

- La température de conservation qui pourrait être 4°C et de 20°C

- Le temps de conservation qui a été étudié à 1 mois, 2 mois, 3 mois

-TMRépétabilité

La faisabilité du test a été possible dans les mêmes conditions

L'efficacité, la stabilité et la répétabilité du test doivent être effectuées pour chaque lot de milieux mis au point. Ce qui nous a permis de valider le test en nous appuyant sur l'équation de BAYES

EQUATION DE BAYES(41)

$$P(t_i/R) = \frac{P(R/t_i)}{\sum P(R/t_i)}$$

$P(t_i/R)$ = probabilité pour qu'un micro-organisme présentant le test R appartienne au taxon t.

$P(R/t_i)$ = probabilité pour que les membres du taxon t présentent le test R.

b) Assurance de la qualité

-> Spécificité

La spécificité de la technique était évaluée avec un Kit commercialisé :

Mycoplasme DUO et Mycoplasma origenics.

Ces milieux étaient ensemencés simultanément avec le milieu mis au point pour une comparaison.

-> Reproductibilité

La reproductibilité était estimée en testant plus d'une fois le même prélèvement avec le patient en prochaine consultation avec le même milieu et avec les différents lots de préparation des mêmes milieux.

-> Rapidité

Elle était déterminée par le temps moyen de réalisation d'un test par le personnel manipulant d'une part et d'autre part par la durée de la lecture finale de la culture.

-> Le coût du Test

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

II- SENSIBILITES AUX ANTIBIOTIQUES

Dans la perspective de mise au point de techniques directement applicables en routine, le laboratoire initie une nouvelle méthode manuelle de l'antibiogramme utilisant les concentrations critiques en microplaques. En effet la croissance trop lente des mycoplasmes ne permet pas d'utiliser l'antibiogramme classique avec la technique des disques en milieux gélosés. Il faut donc procéder à une étude de l'activité antibiotique par la méthode des dilutions en milieu liquide qui permet de définir la CMI (concentration minimale inhibitrice) ou plus exactement la CMM (concentration minimale métabolique).

Puisque la culture est jugée sur la variation du pH qu'entraîne l'hydrolyse de l'urée (Ureaplasma) ou de l'arginine (Mycoplasma hominis).

2-1- Préparation des antibiotiques

2-1-1 Matériel

Plaque de microtitration
 Embouts
 Pipettes de 10 µl, et 1000 µl
 Eau distillée stérile
 Four à microonde
 pH mètre
 Tubes à essai pour les dilutions
 Filtres
 Antibiotiques à tester (+solvants et Diluants)

2-1-2 Antibiotiques à tester

➤ Tétracyclines

Doxycycline est couramment utilisée dans le traitement des infections à mycoplasmes uro-génitaux

Tetracycline est intéressante pour l'étude des profils de résistance aux cyclines, elle permet de dépister les souches qui ont une sensibilité diminuée aux cyclines.

➤ Macrolides

Erythromycine : actif sur ureaplasma avec néanmoins un faible pourcentage de résistance. Résistant sur *Mycoplasma hominis*

➤ Lincosamides

Lincomycine active sur *Mycoplasma hominis* peu active sur Ureaplasma.

➤ Quinolones

Ofloxacin active sur *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*

Pefloxacin : }

Ciprofloxacin ont une activité in vitro qui peut laisser espérer une utilisation thérapeutique

2-1-3- Principe de la préparation des solutions d'antibiotique

- Le principe repose sur la préparation d'une solution mère 200x dans le solvant approprié suivi d'une dilution au 1/100 dans le diluant adéquat pour obtenir la solution de travail
- Cette solution de travail est 200 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure. Les masses à peser dépendent de l'activité potentielle de ces antibiotiques dans les échantillons disponibles. Celle-ci est la quantité de principe actif en μg contenu dans 1mg de produit. La formule permettant de préparer ces solutions est la suivante.

Masse à peser (mg) = volume (ml) x concentration (mg/ml)

 Activité potentielle ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

- La solution de travail contient la quantité requise de produit pour obtenir par une dilution au 1/2 dans la cupule la concentration critique supérieure

La dilution dépend de la concentration critique supérieure et de la concentration critique inférieure à obtenir et par conséquent de l'antibiotique.

Pour : Tétracycline et Doxycycline diluer à la 1/2

Erythromycine, lincomycine ciprofloxacin, pefloxacin ofloxacin diluer au 1/4.

2-1-4 Deshydratation des plaques

Les plaques sont trempées dans de l'eau savonneuse pendant 24h. Après 24h elles sont rincées avec de l'eau puis avec de l'alcool à 70°. On laisse sécher et on stérilise au four micro-onde.

Les antibiotiques ainsi préparées sont distribuées dans la microplaque puis celle-ci est portée à l'étuve pendant 24h à 40°C en présence d'un dessiccateur.

Les plaques ainsi déshydratées sont scellées dans des sachets stériles avec un

dessiccateur et gardées à l'abri de la poussière.

2-2- Réalisation de l'antibiogramme

L'antibiogramme peut être réalisé à partir du contenu d'une cupule x (préparé au moment de l'identification) ou à partir d'un bouillon A₃ ensemencé avec le prélèvement et enrichi en mycoplasmes.

2-2-1- Standardisation de l'inoculum

Afin d'ensemencer l'antibiogramme avec un inoculum contenant 10³ à 10⁵ UCC/ml. Il est indispensable de faire une préculture du milieu ensemencé avec le prélèvement.

Cette préculture conduit à une multiplication des mycoplasmes jusqu'à un titre maximum de 10⁶ à 10⁷ UCC/ml. Une dilution au 1/100ème de cette préculture en bouillon urée ou en bouillon arginine pour obtenir l'inoculum standardisé.

→ Pour *Mycoplasma hominis*

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

→ Pour *Ureaplasma urealyticum*

- à 24h d'incubation réaliser une dilution au 1/100ème

- à 48h d'incubation : dans ce cas il est impossible de repartir de la cupule x (les ureaplasmes risquant d'être autolysés) : réaliser en bouillon urée, une dilution au 1/10ème du milieu de suspension transport qui a été conservé à + 4° (200 µl dans 2ml de bouillon urée).

-> A partir d'un bouillon A₃ enrichi en mycoplasmes : un bouillon A₃ inoculé avec le prélèvement (et 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 16h à 3°C afin de l'enrichir en mycoplasmes. 20 µl de ce bouillon A₃ enrichi sont alors repris dans 2ml de bouillon urée ou arginine (dilution au 1/100ème).

2-2-2- Distribution de l'inoculum standardisé

Distribuer 100 µl de l'inoculum standardisé dans chaque cupule de la microplaque

Recouvrir la microplaque avec l'adhésif et incuber à 37°C pendant 24 à 48h.

2-2-3- Lecture Interprétation

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

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

- 2 cupules jaunes : absence de croissance => souche sensible
- 2 cupules rouges : croissance en présence de l'antibiotique
=> souche résistante.

. cupule à faible concentration d'antibiotique rouge	}	souche intermédiaire
. cupule à forte concentration d'antibiotique jaune		

2-2-4- Précaution d'emploi

Un virage au rouge de l'indicateur de pH, accompagné d'un trouble des bouillons, traduit une croissance microbienne autre que celle des mycoplasmes (la croissance de ces derniers laissant un bouillon parfaitement limpide).

RESULTATS

I- IDENTIFICATION

1-1- Composition finale des milieux de transport et d'identification

1-1-1-° Milieu de transport

└ En fonction de l'extrait de levure

Parmi les 3 solutions d'extrait de levure utilisées, la solution de 0,5% est retenue pour la formule finale, car elle permet d'avoir une meilleure culture en phase exponentielle de croissance lors de l'incubation du milieuensemencé à 37°C pendant 18 heures en donnant après dénombrement sur milieux liquides des titres plus élevés que les 2 autres solutions (0,3% et 0,4%)

└ En fonction de l'antibiotique

L'ampicilline donne des résultats meilleurs à la pénicilline à 1 million U/ml.

1-1-2- Milieu d'identification

a) Bouillon urée

└ En fonction de l'extrait de levure et de l'urée

Les concentrations retenues sont celles de 0,5% pour l'extrait de levure et 10% pour l'urée

Pour les mêmes prélèvements, ces concentrations permettent une lecture de loin plus précoce et un virage de l'indicateur plus franc

└ En fonction du rouge de phénol

un virage franc et net est obtenu avec la solution de rouge de phénol à 5%.

b) Bouillon arginine

Comme dans les cas précédents, les résultats sont meilleurs avec les solutions d'extrait de levure, de l'ampicilline et de rouge de phénol à 0,5%, 1mg/ml et 5% respectivement.

La composition finale adoptée pour les différents milieux est la suivante :

Milieu de transport et de conservation

Milieu de base	80 ml
Sérum de poulain	20 ml
Extrait de levure 0,5%	1,5 ml
L. cystéine à 4%	0,25 ml
Ampicilline	100 mg

Bouillon urée

Milieu de base	95 ml
Sérum de poulain	5 ml
Extrait de levure à 0,5%	2 ml
Urée à 10%	1 ml
L. cystéine à 4%	0,25 ml
Ampicilline	100 mg
Rouge de phénol à 5%	0,1 ml

Bouillon arginine

Milieu de base	65 ml
Sérum de cheval	20 ml
Extrait de levure à 0,5%	10 ml
Ampicilline	100 mg
L. arginine à 25%	2 ml
Rouge de phénol	0,1 ml

Sur les prélèvements, effectués aucune espèce fermentans n'a été isolée ainsi aucune modification n'a été apportée sur la composition du bouillon glucosé.

1-2- Evaluation

1-2-1- Identification

Sur les 179 prélèvements testés, 98 sont positifs dont 72 d'endocol, 2 de sperme, 18 d'urines et 6 d'urètre.

- *Mycoplasma hominis* seuls dans 9 prélèvements
- *Ureaplasma urealyticum* seul dans 50 prélèvements
- *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* associés dans 39 prélèvements (tableau IX)

1-2-2-Titrage

Au niveau de l'endocol, plusieurs prélèvements sont testés jusqu'à des dilutions de 10^{-9} . Le titre le plus élevé est 10^9 Ucc/ml de sécrétions. L'espèce la plus souvent rencontrée est *Ureaplasma urealyticum*.

Avec les prélèvements urétraux, on a un titre de 10^5 Ucc/ml.

Pour le sperme et les urines, on a un titre de 10^4 Ucc/ml de sécrétion.

Les mêmes résultats de titrage sont obtenus lorsque les dilutions sont effectuées les premier et deuxième jours (tableau X).

1-2-3- Viabilité des germes dans le milieu de transport

Pour les souches conservées à 4°C , aucune différence du point de vue identification et titrage n'est observée entre les cultures du premier et du deuxième jour. Par contre les cultures à partir du milieu de conservation gardé 3 jours à 4°C et 1 semaine à -20°C ont donné des résultats différents au niveau du titrage.

Pour les résultats positifs à 10^4 , 10^5 et 10^6 UCC/ml) une perte de 10 à 100 UCC/ml) a été observé (tableau XI)

1-2-4- Stabilité des résultats de la lecture après 48 h d'incubation

La lecture des plaques gardées à l'étuve après 48 heures d'incubation ne montre pas de changement après 48 h supplémentaires

Les mêmes résultats sont obtenus lorsque les plaques sont placées sur la paille.

1-2-5- Assurance de qualité

a) Fiabilité

Sur les 179 prélèvements effectués, la concordance sur le plan identification est de 100% avec *Mycoplasma DUO* et 100% concordance avec *Mycoplasma origenics*.

b) Reproductibilité

Les mêmes échantillons, ou le même patient reprélevé testés avec le même ou différents lots de préparation du même milieu donnent des résultats identiques du point de vue identification et titrage.

c) La rapidité

La moyenne du temps de réalisation d'un test est de 1 mn 30" le temps final de lecture de la culture est de 48 heures car au delà de cette durée aucune modification n'est observée

d) Le coût

Le prix d'un test est estimé a 97,18 francs CFA (on ne tient pas compte du bouillon glucosé) plaque exclue lorsque le test est effectué jusqu'à des dilutions de 10⁻⁹. Le prix de chaque milieu est donné dans le tableau XII)

Tableau IX : RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DU MILIEU

Nature des Prélèvements	Nombre de prélèvements	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Mh/Uu	Total de positifs
Urines	38	3	7	8	18
Sperme	3	0	0	2	2
P.U	13	0	2	4	6
Endocol	125	6	41	25	72
Total	179	9	50	39	98

M.h : *Mycoplasma hominis*

P.U : Prélèvement uretral

U.u : *Ureaplasma urealyticum*

Tableau X RESULTATS DU TITRAGE (titre en UCC/ml)

Nature du prélèvement	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
	Uu Mh	Uu Mh					
Urines	5 9	10 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Sperme	0 1	1 1	0 0	0 1	0 0	0 0	0 0
P.U	2 3	3 1	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Endocol	6 6	9 4	19 11	8 3	6 3	5 0	11 3

U.u = *Ureaplasma urealyticum*

Mh = *Mycoplasma hominis*

Pu = Prélèvement uretral

UCC = Unité changeant coloration

TABLEAU XI : Viabilité des germes sur le milieu de transport

Température de conservation	Titre en UCC/ml		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
	U.u	Mh	U.u
22°C (J1)	30	10	17
4°C (J2)	18	10	17
4°C (J3)	07	2	3
-20°C (J7)	05	1	1

TABLEAU XII : Prix des différents milieux en fonction du volume

	MILIEUX			
	Transport	urée	Arginine	Glucosé
Prix/ 100ml	1728	843	1817	1708

Prix = Francs CFA

Tableau: XIII : Comparaison des résultats Mycoplasma DUO/Technique mise au point (Résultats de Principal)

Nature du prélèvement	Mycoplasma DUO			Milieux mis au point			Total des positifs
	Mh	Uu	Mh/Uu	Mh	Uu	Mh/Uu	
Endocol (24)	0	5	2	0	5	2	7

Tableau XIV : Comparaison des résultats Mycoplasma DUO/Technique mis au point (Résultats de IHS)

Nature du prélèvement	Mycoplasma DUO			Milieux mis au point			Total des positifs
	Mh	U.u	Mh/Uu	Mh	U.u	Mh/Uu	
Endocol (29)	0	14	8	0	14	8	22

Tableau XV : Comparaison des résultats Mycoplasma origenics/Technique mise au point (Résultats du labo bactério-viro Le Dantec)

Nature des prélèvements	Mycoplasma Origenics			Milieux mis au point			Total des positifs
	Mh	U.u	Mh/Uu	Mh	U.u	Mh/Uu	
Urines (38)	3	7	8	3	7	8	18
Sperme (3)	0	0	0	0	0	0	0
P.U (13)	0	2	4	0	2	4	6
Endocol (72)	7	21	3	7	21	3	31

IHS = Institut d'hygiène Social

M.h = *Mycoplasma hominis*

U.u = *Ureaplasma urealyticum*

P.U = Prélèvement urétral

1-3- Commentaire

Nous avons fait des comparaisons des milieux Mycoplasma DUO et de nos milieux mis au point au laboratoire de bactériologie de l'Institut d'Hygiène Social (IHS) et du Laboratoire de Biologie de l'hôpital Principal.

A L'Hôpital Principal, on a pu tester 21 prélèvements d'endocol.. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIII, on note 100% de concordance avec notre technique mise au point.

A l'IHS on a eu 29 prélèvements d'endocol. Là aussi nous avons eu 100% de concordance (voire tableau XIV).

Au Laboratoire de Bactériologie - Virologie de HALD on a pu avoir des prélèvements d'urines (38), de sperme (3) prélèvements urétraux (13) et de prélèvements d'endocol (72). La comparaison a été faite avec Mycoplasma origenics. Nous avons eu 100% de concordance (voire tableau XV).

Ces résultats nous ont permis de calculer des caractéristiques de performance :

- Le coefficient de corrélation K(Kappa) = 1
- La sensibilité (S)

$$S = \frac{\text{vrai résistant}}{\text{vrai résistant} + \text{faux sensible}} \times 100 = 100 \%$$

- La spécificité (Sp)

$$Sp = \frac{\text{vrai sensible}}{\text{vrai sensible} + \text{faux résistant}} \times 100 = 100 \%$$

- La valeur prédictive de sensibilité (VPS)

$$VPS = \frac{\text{vrai sensible}}{\text{vrai sensible} + \text{faux Sensible}} \times 100 = 100\%$$

- La valeur prédictive de résistance (VPR)

$$\text{VPR} = \frac{\text{vrai résistant}}{\text{vrai résistant} + \text{faux résistant}} \times 100 = 100 \%$$

II- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

2-1-EVALUATION

2-1-1- Matériel et Méthodes

→ Souches

25 souches ont été étudiées dont 11 de *Mycoplasma hominis* et 14 de *Ureaplasma urealyticum*. Après isolement ces souches ont été incubées 24 h à 48 h. L'inoculum a été préparé en milieu urée pour *Ureaplasma urealyticum* et en milieu arginine pour *Mycoplasma hominis*.

→ Bouillons urée et arginine (préparés comme précédemment et distribués avec des volumes de 2ml dans des flacons stériles).

→ Kit : Mycoplasma IST destiné au diagnostic des mycoplasmes urogénitaux *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* (culture : identification, numération indicative, test de sensibilité)

→ Plaques prêtes à l'emploi.

Le système mis au point est constitué de :

14 cupules qui contiennent des antibiotiques déshydratés : 2 concentrations d'antibiotiques sont testés pour Doxycycline_tétracycline (4-8 µg/ml) erythromycine_ofloxacin_ pefloxacin_ciprofloxacin (1 - 4 µg/ml) lincomycine (2 - 8 µg/ml).

2 cupules sont utilisées comme témoin de croissance des Mycoplasmes.

Ces microplaques ont étéensemencées (100 µl par cupule) avec un inoculum numéré variant de 10³ à 10⁵ UCC/ml.

Les plaques scellées par un film adhésif ont été incubées à 37°C.

Deux lectures ont été pratiquées, d'après le virage de l'indicateur coloré 24 à 48 h pour *Ureaplasma* et 48 h à 72 h pour *Mycoplasmas hominis*.

L'interprétation n'est faite que lorsque les témoins de croissance sont positifs (virage de l'indicateur). Elle a été faite selon les critères suivants.

- Sensibles : Les souches, dont la croissance était inhibée par les 2 concentrations

- Résistantes : Les souches poussant aux 2 concentrations

- Intermédiaires : Les souches poussant à la concentration la plus faible mais non à la concentration la plus forte.

La bonne reproductibilité du système a été vérifiée sur quelques souches de *Mycoplasma hominis* (6 souches testées en double sur 2 plaques différentes, 1 souche étudiée sur 3 plaques différentes).

2-1-2- RESULTATS :

Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques obtenus avec notre technique mis au point et ceux obtenus par comparaison avec *Mycoplasma IST*, sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

TABLEAU XVI : RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME

AB TESTES	<i>Mycoplasma hominis</i>			<i>Ureaplasma urealyticum</i>		
	S	I	R	S	I	R
Doxycycline	11	0	0	14	0	0
Erythromycine	0	0	11	6	4	4
Tétracycline	9	0	2	10	1	3
Ciprofloxacine	7	0	4	5	2	3
Lincomycine	8	0	3	1	1	12
Ofloxacine	7	0	0	12	0	0

Pefloxacine	5	1	1	3	7	0
-------------	---	---	---	---	---	---

Tableau XVII :résultats comparés techniques mise au point/mycoplasma IST.

	Technique mise au point			Mycoplasma IST		
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>					
AB TESTES	S	I	R	S	I	R
Doxycycline	11	0	0	11	0	0
Erythromycine	0	0	11	0	0	11
Tetracycline	9	0	2	7	2	2
Ofloxacin	7	0	0	7	0	0

	Technique mise au point			Mycoplasma IST		
	<i>Mycoplasma hominis</i>					
AB TESTES	S	I	R	S	I	R
Doxycycline	14	0	0	12	1	1
Erythromycine	6	4	4	8	2	4
Tetracycline	10	1	3	10	1	3
Ofloxacin	12	0	0	12	0	0

2-13- Commentaire

Nous avons eu à tester 25 souches dont 14 d'*Ureaplasma urealyticum* et 11 de *Mycoplasma hominis*. Ces souches ont été sélectionnées du lot de souches identifiées, isolées et titrées. Nous avons eu à choisir les isolats dont les titres varient entre 10^5 et 10^7 UCC/ml afin de respecter les normes de l'antibiogramme des mycoplasmes.

Deux lectures ont été effectuées à 24h et 48h pour *Ureaplasma urealyticum* et pour 48h pour *Mycoplasma hominis*.

Cette étude a été réalisée en comparant simultanément Mycoplasma IST et la

technique que nous avons mise au point. Mycoplasma IST permet de faire en même temps la culture, l'identification, la numération indicative et le test de sensibilité. De ce fait les lectures sont différées de 24h à 48h. La comparaison a porté sur 4 antibiotiques : Doxycycline, ofloxacin, erythromycine et tetracycline. Pour les autres antibiotiques nous n'avons pas eu d'éléments de comparaison.

Dans le tableau XVI, nous n'avons pas eu de profil pour certaines souches à la ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin.

Ceci est dû au fait que la lecture était impossible car il y avait eu virage de l'indicateur dans la cupule ayant eu la concentration la plus forte et non dans celle où la concentration était plus faible.

Le tableau XVII nous montre

→ *Mycoplasma hominis* on a :

Une concordance pour Doxycycline, erythromycine, ofloxacin

Des discordances pour Tétracycline qui présente 9 souches sensibles, 0 intermédiaire et 2 résistantes avec notre technique mise au point alors que pour Mycoplasma IST nous avons eu 7 souches sensibles, 2 intermédiaires et 2 résistantes.

→ *Ureaplasma urealyticum*

Une concordance Tétracycline et ofloxacin

Des discordances pour doxycycline (14 souches sensibles, 0 intermédiaire et 0 résistante) et erythromycine (6 souches sensibles 4 intermédiaires, 4 résistantes) en ce qui concerne notre technique mise au point alors que Mycoplasma IST nous avons eu pour doxycycline(12 sensibles, 1 intermédiaire, 1 résistante) erythromycine (8 souches sensibles, 2 intermédiaires et 4 résistantes).

Les bouillons utilisés pour la sensibilité étaient conçus de la même manière que ceux de l'identification. Donc tous les tests effectués sur les milieux d'identification sont aussi valables pour la sensibilité.

DISCUSSION

Le but de ce travail a été d'améliorer les méthodes d'identification, d'isolement et de titrage des mycoplasmes urogenitaux (*Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*) et de faire une étude préliminaire sur la sensibilité aux antibiotiques.

Ainsi, nous avons mis au point des milieux qui nous ont permis d'isoler 98 souches de *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* obtenues à partir de 179 prélèvements (endocol, P.U, sperme, urines) et de faire une étude préliminaire de la sensibilité aux antibiotiques sur 25 souches dont 11 de *Mycoplasma hominis* et 14 de *Ureaplasma urealyticum*.

Cette étude a été réalisée en comparant la technique mise au point avec des techniques commercialisées de Mycoplasma DUO et Mycoplasma origénics pour l'identification, Mycoplasma IST pour la sensibilité.

Ces milieux ont été préparés à partir des éléments fondamentaux que nous avons amélioré par adjonction d'autres éléments qui les rendent plus performant..

Tous ces milieux modifiés sont conçus à partir d'un milieu préexistant sur lequel on varie la concentration de certains éléments clés de la croissance pour améliorer la qualité (29, 49). En dépit de ces modifications, les limites subsistent encore sur ces milieux comme le montre l'influence de la qualité du milieu de transport au niveau des résultats (36). C'est ainsi que pour la mise au point de ce milieu nous avons utilisé des éléments comme :

- Le sérum de cheval non décomplémenté, stérilisé par filtration, qui apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié.
- L'extrait de levure qui permet la culture de souches de laboratoire adaptées à la culture in vitro. Il apporte le NAD.
- Cofacteurs comme le polivitex qui rend le milieu plus performant en apportant certains oligos éléments

Avec leur capacité de biosynthèse limitée, les mycoplasmes exigent l'adjonction d'éléments nutritifs et leur isolement est aisé par les milieux riches

mais dépourvus de support cellulaire (22).

Nous avons observé quelques cas de souillures qui sont dûs à des contaminants pour les éviter, nous avons utilisé une solution de pénicilline à 1 million par ml (bien que l'ampicilline soit plus efficace). Nous avons également utilisé un mélange d'antibiotiques et d'antifongique VCN:Vancomycine Colistines Nystatine qui offre l'avantage d'inhiber à la fois les contaminants Gram (-) (vancomycine), les bactéries Gram (+) (colistines) et les levures (nystatine).

Certains auteurs préconisent l'adjonction de l'amphotéricine B à 2,5 µg/ml (52) pour éviter les réactions faussement positives aux levures. Mais il faut savoir que cet antifongique à l'inconvénient d'inhiber quelques souches d'*Ureaplasma urealyticum*.

→ Pour la technique :

Les Mycoplasmes génitaux sont des commensaux des voies génitales basses, il apparaît difficile d'affirmer leur responsabilité dans une infection, une appréciation quantitative semble indispensable. Elle est possible si l'on effectue des titrages à partir du prélèvement. Lorsqu'ils sont impliqués dans une pathologie ils sont toujours présents à des titres élevés (6). Il est ainsi important dans les méthodes d'identification de déterminer les titres afin de mieux interpréter un résultat, et de bien déterminer la taille de l'inoculum pour l'antibiogramme car de fausses résistances sont observées lorsque les titres sont élevés (22).

La méthode du screening offre l'avantage du gain de temps (les dilutions ne sont pas faites sur toute la série de la journée) et de l'économie des milieux car les prélèvements négatifs ne sont plus dilués.

→ Les résultats de l'identification

Des 178 prélèvements, 98 ont été positifs soit 54,75 % de la population étudiée. Le but de cette étude, n'était pas de déterminer la prévalence de la population d'étude mais d'évaluer la fiabilité et la sensibilité du test.

Etait considéré comme positif tout prélèvement faisant virer le milieu de culture même en dessous du seuil de pathogénicité qui 10^4 UCC/ml (9,22).

La comparaison faite entre la technique mise au point et les techniques Mycoplasma DUO et Mycoplasma origénics, a révélé une concordance de 100%.

→ Le milieu de transport assure la viabilité des germes le premier jour et le deuxième jour lorsqu'il est conservé à 4°C. A partir du 3ème jour à 4°C et pendant une semaine à -20°C, les germes se conservent mal.

La stabilité des résultats au delà de 48h après l'incubation offre l'avantage de faire des lectures différées pendant le week-end ou les jours fériés.

→ L'assurance de la qualité

→ La confirmation d'une culture positive se fait par repiquage sur milieu solide (gélose A7) avec observation des colonies caractéristiques de chaque espèce. Mais le coût élevé de la gélose A7 ne permet pas toujours son utilisation en routine dans des labo d'analyse médicale.

→ Ainsi, les milieux Mycoplasma DUO et Mycoplasma origénics sont les milieux validés sur le marché et utilisés dans différents laboratoires d'analyse bactériologique.

Les résultats obtenus par comparaison avec ces milieux confirment que le milieu que nous avons mis au point peut être utilisé comme alternative en analyse de routine.

→ La sensibilité aux antibiotiques

Dans la perspective de mise au point de techniques directement applicables en routine, le laboratoire initie une nouvelle méthode manuelle de l'antibiogramme utilisant les concentrations critiques en microplaques. Nous avons fait une étude préliminaire de la sensibilité sur un échantillon de 25 souches dont 11 de *Mycoplasma hominis* et 14 *Ureaplasma urealyticum* et celle-ci a été réalisée en comparaison avec le milieu Mycoplasma IST. Mais ce milieu ne permet de comparer que 4 antibiotiques: Doxycycline, Erythromycine, Tétracycline et Ofloxacine.

Au regard des résultats on constate une concordance pour l'Ofloxacine et Tétracycline et quelques discordances pour Doxycycline et Erythromycine.

Nous avons réalisé cette étude préliminaire dans le but d'établir un protocole standardisé validé facile à utiliser en analyse de routine avec un coût abordable une gamme d'antibiotique élargie.

Ces résultats obtenus malgré un échantillonnage réduit et les difficultés

rencontrées quant à la standardisation de l'inoculum permettront d'améliorer la technique de mise au point et l'utilisation adéquate des antibiotiques actifs sur les Mycoplasmes génitaux.

Rappelons que les Mycoplasmes sont par essence insensibles à tous les antibiotiques qui inhibent la synthèse des constituants de la paroi bactérienne soit toutes les bêtalactamines, la bacitracine, la vancomycine, etc (30).

La péfloxacinine, la ciprofloxacine ont une activité in vitro qui peut laisser espérer une utilisation thérapeutique (30)

L'ofloxacine est actif sur *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*.(30)

Les mycoplasmes sont en principe inhibés par les antibiotiques qui entravent les synthèses protéiques de la cellule bactérienne parmi eux viennent en premier lieu les cyclines. Cette famille représente encore actuellement les antibiotiques préférentiellement prescrits dans les mycoplasmoses(30).

CONCLUSION

Les mycoplasmes sont des micro-organismes vivants les plus petits et les plus simples procaryotes connus capables de s'auto répliquer. Ils sont dépourvus de paroi. Ils sont ubiquitaires et connus dans le règne animal depuis la fin du XIX ème siècle.

Les mycoplasmes sont actuellement considérés comme étant des agents bactériens malgré certaines singularités qui avaient amené leur classification parmi les virus.

Malgré le saprophitisme important de ces agents au niveau de la flore génitale de l'homme et de la femme, ils sont actuellement reconnus comme des agents d'infections chroniques pouvant évoluer vers des conséquences graves chez la femme (salpingites, stérilité, obstruction des trompes etc.) mais également chez l'homme (sténose de l'urètre, infection du sperme, stérilité etc.).

Le rôle pathogène des mycoplasmes est loin d'être élucidé et des études complémentaires selon l'avis de plusieurs auteurs seront nécessaires avant de pouvoir évaluer le rôle exact de cette bactérie en pathologie.

De nos jours l'isolement, l'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques sont faciles, mais le coût élevé des milieux de culture présents sur le marché limite ces applications.

Dans ce travail, il a été préparé des milieux à partir des constituants fondamentaux : sérum de cheval non décomplémenté qui apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié ; un cofacteur comme le polyvitex qui rend le milieu plus performant ; extrait de levure qui permet la culture de souches de laboratoire adaptées à la culture in vitro. Nous avons par la suite mis au point une technique d'isolement, d'identification, de titrage et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Sur un total de 179 prélèvements urogénitaux, nous avons pu isoler et identifier les mycoplasmes dans 98 prélèvements urogénitaux en comparaison avec les milieux Mycoplasma Duo et Mycoplasma Organics. Nous avons avec les deux comparaisons une concordance de 100 %. Sur ces 98 prélèvements positifs, on a choisi un échantillon de 25 souches de mycoplasmes dont 11 de *Mycoplasma*.

hominis et 14 de *Ureaplasma. urealyticum* pour en faire une étude préliminaire de la sensibilité en comparaison avec le milieu Mycoplasma IST. Mycoplasma IST ne permet de comparer qu'avec 4 antibiotiques : doxycycline, Erythromycine, Tétracycline et Ofloxacine.

Le principe de la préparation des solutions d'antibiotiques repose sur la préparation d'une solution mère 200xC dans le solvant approprié suivi d'une dilution au 1/100 ème dans le diluant adéquat pour obtenir la solution de travail.

Cette solution de travail est 200 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure.

La masse à peser dépend de l'activité potentielle de ces antibiotiques dans les échantillons disponibles. Celle-ci est la quantité de principe actif en µg contenu dans 1 mg de produit.

La solution de travail contient la quantité requise de produits pour obtenir par une dilution à la ½ dans la cupule, la concentration critique supérieure.

La dilution dépend de la concentration critique supérieure et de la concentration critique inférieure à obtenir.

Pour les souches d'*Ureaplasma urealyticum*, on a une concordance totale avec Tétracycline et Ofloxacine, et quelques discordances avec Doxycycline et Erythromycine.

Pour les souches de *Mycoplasma hominis*, on a une discordance avec tétracycline et concordance avec doxycycline, Erythromycine et Ofloxacine.

Cette technique que nous avons mise au point offre plusieurs avantages :

- ❖ Sur l'identification : elle permet d'identifier séparément des espèces de mycoplasmes génitaux, donc de bien préciser les doubles infections,
- ❖ Sur le plan diagnostique, par la méthode des dilutions, elle permet de déterminer des titres élevés d'un prélèvement par conséquent d'interpréter plus facilement l'implication des mycoplasmes dans certaines pathologies
- ❖ Sur le plan thérapeutique, la méthode permet de faire le bon choix d'un inoculum pour l'antibiogramme. Elle offre l'opportunité de tester une gamme plus large d'antibiotiques.
- ❖ Au plan de l'évaluation, la méthode, par sa fiabilité et sa sensibilité identiques à celles des milieux Mycoplasma Duo et Mycoplasma Origenics représente un bon

milieu, d'identification, d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux et pouvant être utilisée comme alternative pour des analyses de routine dans les pays en développement.

Vu le rôle des mycoplasmes dans diverses infections de la sphère urogénitale, une nouvelle éducation thérapeutique doit être envisagée par les cliniciens quant à l'utilisation d'antibiotiques pour le traitement des infections à mycoplasme.

Dans le but d'élargir l'utilisation d'antibiotiques à large spectre et très efficaces sur les mycoplasmes permettant de palier certains échecs thérapeutiques, des améliorations seront apportées sur la réalisation de l'antibiogramme.

EN ANTIBIOTHERAPIE, IL FAUT FRAPPER VITE, FORT ET JUSTE

BIBLIOGRAPHIE**1-AVRIL J.L.,DABERNAT H.,DENIS F.,MONTEIL H.**

Mycoplasma - Ureaplasma

Bactériologie clinique Edition Ellipses, Paris, 1988, **39**,
481-491

2- BEBEAR C.

Les infections à mycoplasmes génitaux

Rev.Eur.Dermatol.MST,1990,**2**,7-14

3 BEBEAR CH.

Les infections à mycoplasmes en gynécologie obstétrique

Microsoft internet Explorer, 1-6

4-BEBEAR C.,DE BARBEYRAC B., BERNET C.,RENAUDIN H.

Méthodes d'exploration des infections à mycoplasme

Ann.Biol. Clin. ,1989,**47**,415-420

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

Infections urogénitales et mycoplasmes

Sem.Hôp. Paris, 1978, **54**, 107-111

6-BEBEAR C., LATRILLE J.

Mycoplasmes

Bactériologie Médicale Leon-Le Minor, Ed. Flammarion Paris,
1990, 1088-1097

7-BENET A.H.,KUNDSIN R.B., SHAPIRO S.R.

T strain Mycoplasmas, the ethiologic agent of non specific urethriticis: a venereal disease

J.of urology, 1973,**109**, 427-429.

8-BENTSICETAL

Genital infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, in Ghanaian women

Genito.urino.Med., 1985, **61**, 48-50.

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**, 506-513

10-BINISSOL C., GILBERT M., IVANOVA L.M.

Les mycoplasmes urogénicaux

Ann.Microbiol., Inst.Pasteur, 1978, **129B**, 245-265

11-BONISSOL CH.

Biologie des mycoplasmes

Bull.Mem.Soc.Med, Paris, Tome III N°6

12-BONISSOL CH.

Isolement et identification des mycoplasmes urogénitaux

Méd. Mal. Infect., 1980, **10**, 640-646

13-BRES P. RAOULT D.

Les mycoplasmes

89ème congrès ASM

lettres Infect., 1989, TomeIV, **14**, 553-554

14-BRIDE J., DONATIEN A.

Le microbe de l'agalactie contagieuse et sa culture in vitro

CR.Acad.Sci., 1923, **177**, 841.

15-BRUNNER H., WEIDNER W., SCHIEFER H.G.

Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and

Mycoplasma hominis in prostatitis

16-CAHIERS DE SANTE PUBLIQUE, OMS, GENEVE

Conséquences de l'infection génitale chez la femme
Genève, 1976, **65**, 13

17-CASSEL G.H., COLE B.C.

Mycoplasmas as agent of human diseases
N.Engl J.Med., 1981, **304**, 80-89

18-CASSEL GH., WAITES K.B., CROUSE D.T., RUDD P.T., CANUPP K.C., STAGHO S., CUTTER G.R.

Association of Ureaplasma urealyticum infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very low birth weight infants
Lanat, 1988, **11**, 240-244

19-CATALAN F., LEVENTIS S., KHOURY B., SIBOULET A.

A propos des infections à mycoplasmes
Application pratique au diagnostic des maladies sexuellement transmissibles
Inst.ALFRED FOURNIER, Paris, 1984, **101**, 21-34

20-CHANOCK R.M., HAYFLICK L., BARILE M.F.

Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumoniae and its identification as a PPLD
Proc.Nat.Acad.Sci.Wash, 1962, **48**, 41-49

21-DENIS F.

Mycoplasmes
CES de Bactériologie - Virologie clinique Dakar 1978

22-DIENG SARR A.

Les mycoplasmes
CES Bactériologie - Virologie

23DIENES L., ESDALL G.

Observation on the L organisms of KLIENEBERGER

Pror.Soc.Exp.Biol.Med.,1937, **56**,740-744.

24-EATON M.D., MEIKLE JOHN G., GERICK W.

Studies on the ethiology of primary atypical pneumoniae

A filtrable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos

J.Exp.Med., 1944, **79**, 649-668.

25-EB.F.; ORFILA J.

Mycoplasma genitoux rôle pathogène diagnostic

Med.Mal.Infect., 1985,**9bis**, 491-494.

26-ESCARGUEL C., PAPIEROCK

La sérologie des mycoplasmes urogénitaux

Spectra biologie., 1988; **89/6**, 39-42.

27- ESCHENBACH D.A., BUCHANAN T.P., POLLOCK H.N., and Al

Polymicrobiol. Etiology of acute pelvic inflammatory disease.

N. Eng. J. Med., 1975, 293, 166-171.

28-FARI A.

Recherche et identification d'une infection génitale

Encycl.Med.Chirur., Paris, Gynecol, **73**¹⁰,12-1986, 1-6.

FARI A.

Résistance des mycoplasmes antibiothérapie

Infectiol., 1987, **15**, 23-33.

29-FIACCO V., MILLER M.J., CARNEY E., MARTIN J.W.

Comparaison of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital mycoplasma species J clin

Microbiol., 1984,, **20**, 862-865.

30- GAUDIN OG.

Infection humaines à mycoplasme

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

31-HENRY SUCHET J.

Infection en gynécologie, les moyens actuels de diagnostic et de
traitement

Actualités gynécologiques (Paris 1971), 1991,**22**,101-112.

32-JAUL N.DOBLE A., GILCHRIST C.,TALYOR ROBINSON D.

Infection of the epididymis by *Ureaplasma urealyticum*
Genitorius Med., 1988, **64**,367-368.

33--KENNY GEORGE E.

Mycoplasmas

Manuel of clinical Microbiology,Fourth Edition, 1985, 407-411

34-KENNY GEORGE E.

Mycoplasmas

Manuel of clinical microbiology, Fifth Edition, 1990,
478-482

35-KLIENEBERGER E.

The natural occurrence of pleuro-pneumonia-like organisms in apparent
symbiosis with streptobacillus moniliformis and other bacteria

J.Patholol.Bacteriol., 1985, **40**, 93-105.

**36-KUITEN G., MUYIAO U., WANFANG YU., HOUJUNLI., DAWEI SHEN.,
DEXIANG LIU.**

Comparaison of PCR with culture for detection of Ureaplasma in clinical
samples from patients with urogenital infections

J.clin microbiol., 1994; **34**, 2232-2234.

37-LATRILLE J.

Les mycoplasmes

Bacteriologie Medicale Leon-Le-Minor. Ed Flammarion
Medecine sciences, Paris, 1982, 758-766.

38-LEE J.T., XIAOTAN ZHEN., GLASS J.I., WATSON H.L., TSAI J., CASSEL G.H.

Ureaplasma urealyticum biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene J. Clin Microbiol., 1994,**32**, 1464-1469

39-LENETTE E.H., SCHMIT N.J.

Diagnostic procedure in viral and kickettsial infections
Am.Publ.Health Ass., 1969; **102**, 52-58.

40-MARDH P.A.

M.hominis: A neglected human pathogen
Eur.J.clin Microbiol, 1983, **2**, 303-308.

41-MULLER M.J., O'HARA C.H.

Substrate utilisation systems for the identification of an Yeasts
103-109

42-NDOUR M.A.NG.

Les mycoplasmes dans les infections urogénitales de la femme à Dakar
(Résultats préliminaires)

Thèse pharmacie: Dakar, 1988, **57**

43- NOWACKS J.

Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripneumonie des
Bovidés

Ann.Inst.Pasteur, 1929, **43**, 1330-1352

44-PAPIEROCK G., PAUTRAT G., ESCARGUEL C.

Les mycoplasmes: leur place en microbiologie
Revue française des laboratoires, Novembre 1992, 244

45-PEROL Y., LATRILLE J.

Diagnostic biologique des infections humaines à mycoplasmes
Med.Mal.Infect., 1975, **5**, 265-276

**46-PILET C., BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAL N., BALBASTRE C.,
PERSON J.M.**

Famille des Mycoplasmataceae
Bactériologie médicale et vétérinaire, 1987, 353-359

47-QUENTING C., CANTET P., RENAUDIN H., BEBEAR C.

Sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes pathogènes pour l'homme
Pathol.Biol., 1985, **33**, 205-212

48-RAZIN S.

Structure and fonction of Mycoplasma
Ann.Rev.Microbiol., 1969, **23**, 316-356

**49-RENATA-CHAUDRIKA F., HENRICH B., KOLB-BCHOFEN U.,
HADDING U.**

Decreased metabolism and viability of *Mycoplasma hominis* inducted by
monoclonal antibody mediated agglutination
Infect.Immu., 1992, **60**, 166-174

50-ROBERTSON J.A.

Potential virulence factors of *Ureaplasma urealyticum*
Pediatr.Infect.Dis., 1986, **5**, S222-S235

51-SHEPARD M.C.

Recovery of PPLO from negro men with and without non gonococcal
urethritis
Am.J.Syph.Gonoc.Vener.Dis., 1954, **38**, 113-124

52-SHEPARD M.C., LUNCEFORD C.L.

Urease color test medium U-9 for the detection and identification of "T"
Mycoplasma in clinical material
Appl Microbiol., 1970, **20**, 539-543

53-SIBOULET A., BOHBOT J.M.

Infections urogénitales à mycoplasmes T: traitement et rôle dans la stérilité

Bull.Mem.Soc.Med., Paris, 1980, **6**, 176-1

54-THOUVENOT D., BOSSHARD S.

Les mycoplasmes
Manuel de Bactériologie Clinique, 1992, **2**, 1205-1218

**55-WEIDNER W., KRAUSE W., SCHEIEFFER H.G., BRUNNER H.,
FRIEDRICH H.J.**

Ureaplasma infection of the male urogenital tract in particular prostatitis and
semen quality
Urol.Ins., 1985, **40**, 5-9

Plan

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

1^{ère} Partie : Généralités

I- HISTORIQUE	2
---------------------	---

II-TAXONOMIE.....	4
-------------------	---

III- CARACTERISTIQUES DES MYCOPLASMES	8
---	---

3-1-HABITAT	8
-------------------	---

3-2- MORPHOLOGIE ET STRUCTURE	9
-------------------------------------	---

3-2-1- <i>Morphologie</i>	9
---------------------------------	---

3-2-2- <i>Structure</i>	10
-------------------------------	----

3-3- MODE DE DIVISION	11
-----------------------------	----

3-4- TYPE RESPIRATOIRE.....	11
-----------------------------	----

3-5- CARACTERES CULTURAUX.....	11
--------------------------------	----

3-5-1- <i>Milieus de culture</i>	11
--	----

3-5-2- <i>Aspect des colonies</i>	13
---	----

3-6- CARACTERES BIOCHIMIQUES	15
------------------------------------	----

3-6-1 <i>Métabolisme glucidique</i>	15
---	----

3-6-2 <i>Métabolisme lipidique</i>	15
--	----

3-6-3 <i>Métabolisme protidique</i>	16
---	----

3-6-4 <i>Activité hémolytique</i>	17
---	----

3-6-5 <i>Autres caractères</i>	17
--------------------------------------	----

3-7- STRUCTURE ANTIGENIQUE	19
----------------------------------	----

3-8- GENETIQUE.....	20
---------------------	----

3-9- SENSIBILITE AUX AGENTS PHYSICOCHIMIQUES/RESISTANCE /CONSERVATION	20
---	----

IV- EPIDEMIOLOGIE	21
-------------------------	----

4-1- CHEZ LE NOUVEAU NE.....	21
------------------------------	----

4-2- CHEZ L'ADOLESCENT A LA PUBERTE	21
---	----

4-3- CHEZ L'ADULTE	21
--------------------------	----

V- POUVOIR PATHOGENE	23
5-1- PATHOGENIE.....	24
5-2- MYCOPLASMES ET INFECTIONS DU TRACTUS GENITAL CHEZ L'HOMME	24
5-2-1- <i>Urétrite non gonococcique</i>	24
5-2-2- <i>Prostatite aiguë et chronique</i>	25
5-2-3- <i>Epididymite</i>	26
5-3- MYCOPLASME ET INFECTIONS GYNECOLOGIQUES	26
5-3-1- <i>Vaginites et cervitites</i>	26
5-3-2- <i>Endométrites, salpingites, inflammations pelviennes</i>	26
5-4- MYCOPLASMES ET TROUBLES DE LA REPRODUCTION.....	27
5-4-1- <i>° Stérilité</i>	27
5-4-2- <i>Pathologie au cours de la grossesse</i>	27
5-5- ATTEINTES NEONATALES	27
5-6- MYCOPLASMES ET SIDA LA NOTION DE COFACTEUR.....	28
5-7- MYCOPLASMES ET CANCER.....	29
5-8- INFECTIONS DIVERSES.....	29
VI- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	30
6-1- DIAGNOSTIC DIRECT	30
6-1-1- <i>Prélèvements</i>	30
6-1-2- <i>Transport et conservation</i>	30
6-1-3- <i>Isolement et identification</i>	31
6-2- DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE	32
VII- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	34

2^{ème} Partie : Travail Personnel

MATERIELS ET METHODES	37
I- ISOLEMENT IDENTIFICATION.....	37
1-1-° PREPARATION DES MILIEUX	37
1-1-1 <i>Matériel</i>	37
1-1-2- <i>Méthode</i>	38
1-2- ISOLEMENT ET IDENTIFICATION.....	40
1-2-1 <i>Matériel</i>	40
1-2-2 <i>Méthodes</i>	41

1-3- EVALUATION	44
1-3-1 Matériel	44
1-3-2 Méthodes.....	44
II- SENSIBILITES AUX ANTIBIOTIQUES.....	46
2-1- PREPARATION DES ANTIBIOTIQUES	47
2-1-1 Matériel	47
2-1-2 Antibiotiques à tester.....	47
2-1-3- Principe de la préparation des solutions d'antibiotique	48
2-1-4 Deshydratation des plaques.....	48
2-2- REALISATION DE L'ANTIBIOGRAMME.....	51
2-2-1- Standardisation de l'inoculum.....	51
2-2-2- Distribution de l'inoculum standardisé	52
2-2-3- Lecture Interprétation	52
2-2-4- Précaution d'emploi	52
RESULTATS	53
I- IDENTIFICATION.....	53
1-1- COMPOSITION FINALE DES MILIEUX DE TRANSPORT ET D'IDENTIFICATION	53
1-1-1- ° Milieu de transport	53
1-1-2- Milieu d'identification	53
1-2- EVALUATION	55
1-2-1- Identification	55
1-2-2-Titrage	55
1-2-3- Viabilité des germes dans le milieu de transport	55
1-2-4- Stabilité des résultats de la lecture après 48 h d'incubation.....	55
1-2-5- Assurance de qualité	56
1-3- COMMENTAIRE.....	60
II- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	61
2-1-EVALUATION.....	61
2-1-1- Matériel et Méthodes.....	61
2-1-2- RESULTATS :.....	62
2-13- Commentaire	64
DISCUSSION	66
CONCLUSION.....	70
BIBLIOGRAPHIE	73

