

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE



ANNEE 1991

THESE N° 130/11



106 008594 6

**DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET
PLACE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES
A MYCOPLASMA PNEUMONIAE**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

obtenue après soutenance du
MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

présentée et soutenue publiquement le 7 JUIN 1991

Par

Jean-Marie ROUSSIE

né le 3 juillet 1959 à MARRAKECH

JURY

Monsieur Le Professeur BONNAUD
Mademoiselle Le Professeur TIXIER
Monsieur Le Professeur DENIS
Monsieur Le Professeur NICOLAS

Président
Juge
Juge
Juge

THESE N° 130/11 1991 U 130



Ex 1
S.i.b.i.P : 317 810

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1991

THESE N° 30

**DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET
PLACE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES
A MYCOPLASMA PNEUMONIAE**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

obtenue après soutenance du
MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

présentée et soutenue publiquement le 7 JUIN 1991

Par

Jean-Marie ROUSSIE

né le 3 juillet 1959 à MARRAKECH

JURY

Monsieur Le Professeur BONNAUD
Mademoiselle Le Professeur TIXIER
Monsieur Le Professeur DENIS
Monsieur Le Professeur NICOLAS

Président
Juge
Juge
Juge

U N I V E R S I T E D E L I M O G E S

F A C U L T E D E M E D E C I N E

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **BONNAUD**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **PIVA**
Monsieur le Professeur **COLOMBEAU**

PERSONNEL ENSEIGNANT

. PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ADENIS Jean-Paul	Ophtalmologie
ALAIN Luc	Chirurgie infantile
ARCHAMBEAUD Françoise	Médecine interne
ARNAUD Jean-Paul	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BARTHE Dominique	Histologie, Embryologie
BAUDET Jean	Clinique obstétricale et Gynécologie
BENSAID Julien	Clinique médicale cardiologique
BONNAUD François	Pneumo-Phtisiologie
BONNETBLANC Jean-Marie	Dermatologie
BORDESSOULE Dominique	Hématologie et Transfusion
BOULESTEIX Jean	Pédiatrie
BOUQUIER Jean-José	Clinique de Pédiatrie
BRETON Jean-Christian	Biochimie
CAIX Michel	Anatomie
CATANZANO Gilbert	Anatomie pathologique
CHASSAIN Albert	Physiologie
CHRISTIDES Constantin	Chirurgie thoracique et cardiaque
COLOMBEAU Pierre	Urologie
CUBERTAFOND Pierre	Clinique de chirurgie digestive
de LUMLEY WOODYEAR Lionel	Pédiatrie
DENIS François	Bactériologie - Virologie
DESCOTTES Bernard	Anatomie
DESPROGES-GOTTERON Robert	Clinique thérapeutique et rhumatologique
DUDOGNON Pierre	Rééducation fonctionnelle
DUMAS Michel	Neurologie
DUMAS Jean-Philippe	Urologie
DUMONT Daniel	Médecine du Travail
DUPUY Jean-Paul	Radiologie
FEISS Pierre	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale
GAINANT Alain	Chirurgie digestive
GAROUX Roger	Pédopsychiatrie
GASTINNE Hervé	Réanimation médicale
GAY Roger	Réanimation médicale

GERMOUTY Jean	Pathologie médicale et respiratoire
GUERET Pascal	Cardiologie et Maladies vasculaires
HUGON Jacques	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
LABADIE Michel	Biochimie
LABROUSSE Claude	Rééducation fonctionnelle
LASKAR Marc	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
LAUBIE Bernard	Endocrinologie et Maladies métaboliques
LEGER Jean-Marie	Psychiatrie d'Adultes
LEROUX-ROBERT Claude	Néphrologie
LIOZON Frédéric	Clinique Médicale A
LOUBET René	Anatomie pathologique
MALINVAUD Gilbert	Hématologie
MENIER Robert	Physiologie
MERLE Louis	Pharmacologie
MOREAU Jean-Jacques	Neurochirurgie
MOULIES Dominique	Chirurgie infantile
NICOT Georges	Pharmacologie
OLIVIER Jean-Pierre	Radiothérapie et Cancérologie
OUTREQUIN Gérard	Anatomie
PECOUT Claude	Chirurgie orthopédique et traumatologique
PESTRE-ALEXANDRE Madeleine	Parasitologie
PILLEGAND Bernard	Hépatologie-Gastrologie-Entérologie
PIVA Claude	Médecine légale
RAVON Robert	Neurochirurgie
RIGAUD Michel	Biochimie
ROUSSEAU Jacques	Radiologie
SAUVAGE Jean-Pierre	Oto-Rhino-Laryngologie
TABASTE Jean-Louis	Gynécologie - Obstétrique
TREVES Richard	Thérapeutique
VALLAT Jean-Michel	Neurologie
VANDROUX Jean-Claude	Biophysique
WEINBRECK Pierre	Maladies infectieuses

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

A MES PARENTS

A MARTINE

A ANNE

A TOUTE MA FAMILLE

Merci de votre aide et de votre confiance.

Avec toute mon affection

A TOUS MES AMIS

Merci.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE
Monsieur le Professeur BONNAUD

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury.
Vous avez témoigné à notre égard
de votre confiance et de votre disponibilité.

Veillez trouver ici le témoignage de notre gratitude
et de notre profond respect.

A NOTRE DIRECTEUR DE THÈSE

Monsieur le Professeur DENIS

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail.

Votre dynamisme et vos compétences nous ont permis d'apprécier la Bactériologie-Virologie.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur NICOLAS

Vous nous avez toujours accueilli avec générosité
et compréhension.

Veillez trouver ici le témoignage
de notre profonde reconnaissance.

Mademoiselle le Professeur TIXIER

Votre disponibilité et vos conseils nous ont été précieux tout au long de notre internat.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I- HISTORIQUE

11- Mycoplasmes

12- Mycoplasma pneumoniae

II - CLASSIFICATION

III - PROPRIETES

31- Propriétés communes aux mycoplasmes

32- Propriétés spécifiques de mycoplasma pneumoniae

IV - POUVOIR PATHOGENE DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE

41- Epidémiologie

42- Transmission

43- Immunité

44- Pathogénicité

45- Manifestations cliniques

V - BASES DU TRAITEMENT

51- Traitement curatif

52- Prévention

DEUXIEME PARTIE : METHODES DE DIAGNOSTIC

I - ANOMALIES BIOLOGIQUES NON SPECIFIQUES

11- Sériques

12- Fonction hépatique

13- Fonction rénale

14- Liquide céphalo-rachidien

15- Oropharynx

II - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DIRECT

21- Prélèvements

22- Transport et conservation des prélèvements

23- Examen direct

24- Diagnostic rapide : mise en évidence des antigènes

25- Culture cellulaire

26- Culture sur milieu synthétique

III - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE INDIRECT OU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

31- Immunofluorescence indirecte (IFI)

32- Réaction de fixation du complément (RFC)

33- Hémagglutination indirecte (HAI)

34- Réactions d'inhibition de croissance et d'inhibition
métabolique

35- Dosage ELISA

36- Test d'inhibition de l'adhésion de mycoplasma
pneumoniae a des globules rouges de mouton en
présence d'anticorps spécifiques

37- Agglutination de particules sensibilisées

38- Contre immunoélectrophorèse

310- Dosage radioimmunologique

IV - DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

41- Pneumopathie atypique primitive

42- Mycoplasmes autres que mycoplasma pneumoniae

TROISIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE PROSPECTIVE

I - MATERIEL ET METHODES

- 11- Patients
- 12- Matériel
- 13- Méthodes

II - RESULTATS

- 21- Résultats cliniques
- 22- Résultats biologiques
- 23- Autres tests biologiques effectués
- 24- Conclusion

III - DISCUSSION

- 31- Patients
- 32- Avantages et inconvénients des différentes modalités de prélèvements
- 33- Intérêt du milieu de culture expérimental
- 34- Intérêt des autres tests effectués

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

- A : Adénine
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal
- ATPase : Adénosine Triphosphatase
- BM : Bleu de Méthylène
- BK : Bacille de Koch
- C : Cytosine
- CIE : Contre Immunoélectrophorèse
- CMM : Concentration Minimale Métabolique
- CMV : Cytomégalovirus
- CRP : C-Réactive Protéine
- Da : Dalton
- EBV : Epstein Barr Virus
- ECBC : Examen Cytobactériologique des Crachats
- ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines
- ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- FAB : Fibro-Aspiration Bronchique
- G : Guanine
- G+C% : Guanine + Cytosine %
- GR : Globules Rouges
- GS : Gélose au Sang

- H : Heure
- HAI : Hémagglutination Indirecte
- HAV : Hépatite Virale A
- HBV : Hépatite Virale B
- HIV (VIH) : Human Immunodeficiency Virus
- IF : Immunofluorescence
- IFD : Immunofluorescence Directe
- IFI : Immunofluorescence Indirecte
- Ig (A, G, M) : Immunoglobuline (A, G, M)
- IRA : Insuffisance Rénale Aigüe
- IRC : Insuffisance Respiratoire chronique
- J : Jour
- KDa : KiloDalton
- l : Litre
- LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
- LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
- LDH : Lactico-Déshydrogénase
- MDa : MégaDalton
- MCE : Milieu de Culture Expérimental
- MK : Mycoplasma Kit
- ml : Millilitre
- mm : Millimètre
- MNI : Mononucléose Infectieuse
- N : Normal
- Nb : Nombre

- NFS : Numération Formule Sanguine
- ng : Nanogramme
- nm : Nanomètre
- N.R : Non Recherché
- ORL : Oto-Rhino-Laryngologie
- PAP : Pneumopathie Atypique Primitive
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PFLA : Pneumopathie Franche Lobaire Aigüe
- PN : Polynucléaires
- PPLO : Pleuro Pneumoniae Like Organisms
- RFC : Réaction de Fixation du Complément
- SI : Soins Intensifs
- SIDA : Syndrome Immunodéficientaire Acquis
- T : Thymine
- TGO : Transaminases Glutamo-Oxalo-Acétiques
- TGP (ALAT) : Transaminases Glutamo-Pyruviques
- TZ : Tétrazolium
- UCC : Unité provoquant un Changement de Couleur
- UFC : Unité Formant Colonie
- UI : Unités Internationales
- VRS : Virus Respiratoire Syncytial
- VS : Vitesse de Sédimentation
- µm : Micromètre

INTRODUCTION

Mycoplasma pneumoniae appartient à la famille des Mycoplasmataceae.

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivant à l'état libre, doués du pouvoir de synthèse et de vie autonome. Ils se distinguent des virus et des bactéries par des caractères fondamentaux.

Mycoplasma pneumoniae est un pathogène indiscutable de l'homme, quoique souvent méconnu. Son tropisme tissulaire est large.

Il serait impliqué dans 10 à 30 % des pneumopathies communautaires. Le diagnostic de certitude d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae* est long et difficile.

Toutefois des progrès récents dans la connaissance de la structure antigénique et génomique du micro-organisme permettent d'envisager à court terme le développement de techniques performantes, rapides et fiables.

Nous nous proposons, après un rappel concernant les propriétés des mycoplasmes et en particulier de *Mycoplasma pneumoniae*, d'exposer les principaux moyens de diagnostics (directs et indirects) actuels et futurs et de rapporter une étude prospective de diagnostic biologique des affections pulmonaires mycoplasmaïques par les moyens actuellement disponibles au CHU de Limoges, dont un milieu de culture pour *Mycoplasma pneumoniae* en cours d'expérimentation.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I - HISTORIQUE

11- MYCOPLASMES

Le premier mycoplasme, agent de la péripneumonie des bovidés, a été isolé et cultivé par **NOCARD** et **ROUX** dès 1898 (3).

Ces auteurs constatèrent sa faible taille et son caractère filtrable mais ne purent, malgré les forts grossissements et les colorations, en déterminer la forme exacte à l'examen microscopique.

Ce germe sera ultérieurement désigné sous le nom de *Mycoplasma mycoides*.

Deux ans plus tard, **DUJARDIN-BAUMETZ** parvint à cultiver ce micro-organisme sur des milieux solides et décrivit l'aspect très caractéristique des colonies dit en "oeuf sur le plat" (3, 43).

En 1910, **BORREL** et **BORDET** étudiant la morphologie de cette espèce, constatèrent qu'il pouvait se présenter sous diverses formes et le dénommèrent *Asterococcus mycoides* (43).

BRIDRE et **DONATIEN** ont isolé en 1923 un germe possédant des propriétés identiques à celles de *Mycoplasma mycoides*, responsable de l'agalactie contagieuse des ovins et des caprins (93).

En 1929, **ELFORD** a mis en évidence l'existence d'organismes vivants ayant une taille de 125 à 150 nm (22).

A cette époque, la taille était un critère majeur pour définir les virus ; nombreux sont ceux qui ont considéré cet organisme comme un virus en dépit de son aptitude à pousser sur des milieux artificiels.

De nombreux autres organismes, possédant les mêmes caractéristiques, seront ultérieurement isolés chez différentes espèces animales. Ils furent un temps regroupés sous le terme de Pleuro pneumoniae Like Organisms ou PPLO.

En 1929, **NOWAK** (43) a attribué pour la première fois le nom de Mycoplasma à ces germes d'origine variée (Mycose = champignon, plasma = forme).

En 1935, au Lister Institut, **KLINEBERGER-NOBEL** a isolé à partir d'une culture d'un streptobacille, des variants microbiens dépourvus de paroi, dits forme "L" (ou bactéries déficientes). Ces formes filtrables sont actuellement désignées sous le terme de (3, 22) :

- protoplastes lorsqu'ils dérivent de bactéries à Gram positif,
- sphéropastes lorsqu'ils dérivent de bactéries à Gram négatif.

En culture, l'aspect des colonies de ces bactéries est le même que celui des mycoplasmes, rendant leur différenciation délicate.

Les mycoplasmes sont isolés à partir de nombreux animaux, mais aussi à partir de l'environnement et des plantes. En 1936, **LIDLAW** et **ELFORD** ont décrit des espèces saprophytes pouvant se rencontrer dans des milieux naturels tels que le sol, les boues d'égout ou le fumier : il s'agissait de *Mycoplasma laidlawii* actuellement appelé *Acholeplasma laidlawii* (93).

En 1937, **DIENES** et **EDSALL** isolèrent à partir d'un pus de bartholinite le premier mycoplasme humain (3, 43).

En 1944, **EATON** a étudié puis cultivé sur oeuf embryonné l'agent d'"Eaton" obtenu à partir d'expectorations humaines ; celui-ci ne sera étudié et reconnu comme pathogène pour l'homme que beaucoup plus tard (22).

En 1954, **SHEPARD** a isolé à partir de pus d'urétrites non gonococciques, un mycoplasme qui a donné en culture des colonies minuscules : souche T (T pour Tiny). Son aptitude à hydrolyser l'urée le fera appeler *Ureaplasma* (22).

La première classification a été proposée par **EDWARD** en 1965 ; baptisant les micro-organismes qui n'étaient pas des formes "L" du nom de mycoplasme, il reprenait ainsi une ancienne dénomination proposée par Nowak en 1929 (43).

En 1972, **BOVE** a isolé à partir de végétaux puis d'insectes et de souris, des mycoplasmes appelés *Spiroplasma* en raison de leur morphologie proche de celle des spirochètes (93).

12- MYCOPLASMA PNEUMONIAE

En 1938, **REIMANN** a décrit un groupe de pneumopathies dites pneumopathies atypiques primitives, dont l'agent causal était alors inconnu. La mise en évidence fortuite dans le sérum des patients d'un fort titre en agglutinines froides fournira par la suite un moyen diagnostique indirect (22).

Au cours de la Seconde Guerre Mondiale, la Commission des armées sur les infections respiratoires a défini plusieurs caractères cliniques de la maladie (22).

En 1943, **EATON** a isolé un germe à partir d'expectorations d'un patient atteint de pneumopathie atypique primitive par inoculation du produit pathologique à des oeufs embryonnés et provoqué des pneumonies chez le rat et le hamster par inoculation de filtrats de salive du patient d'une part, et de matériel provenant des oeufs infectés d'autre part (22).

Des données épidémiologiques et sérologiques prouvèrent alors que l'agent d'"Eaton" était responsable de maladies respiratoires chez l'homme.

L'agent d'"Eaton" fut d'abord considéré comme un virus, en raison de sa filtrabilité et de l'échec de toutes les tentatives d'isolement et de multiplication sur les milieux de culture bactériens disponibles à cette époque.

Sa taille fut évaluée entre 125 et 150 nm d'après sa filtrabilité sur membrane, mais la sensibilité de cet agent à la streptomycine, à la chlortétracycline et aux sels d'or infirma cette hypothèse.

En 1957, LIU a observé par immunofluorescence, la présence de l'agent infectieux à la surface de l'épithélium bronchique d'embryons de poulet infectés congelés (22, 93).

Plusieurs observations permirent alors de penser que l'agent d'"Eaton" était un mycoplasme, notamment par la découverte de structures extra-cellulaires immunofluorescentes dans les préparations colorées de cultures infectées.

Ce n'est qu'en 1962 que CHANOCK et HAYFLICK parvinrent à cultiver *Mycoplasma pneumoniae* sur un milieu acellulaire proche de celui de Edward, mais modifié par Hayflick (22, 43).

En effet, les milieux de culture pour mycoplasmes disponibles à l'époque n'étaient pas assez riches en facteurs de croissance pour permettre le développement de *Mycoplasma pneumoniae*.

Mycoplasma pneumoniae sera donc le premier mycoplasme pathogène pour l'homme à être cultivé, isolé, décrit et dont le pouvoir pathogène est reconnu.

II - CLASSIFICATION

A l'origine, les mycoplasmes sont placés dans la classe des Schizomycètes et l'ordre des Actinomycètes, puis celui des Mycoplasmatales.

En 1973, du fait de leurs propriétés particulières, tous les mycoplasmes sont réunis dans la classe des Mollicutes (Mollicutes = peaux molles), qui se place entre celle des Schizomycètes et celles des Microtobiotes (regroupant : Rickettsies, Chlamydiae et virus)(93).

L'absence de paroi rigide, donnant à ces micro-organismes un aspect pleiomorphe, a motivé la création au sein des procaryotes, de la division des ténurites dont les mollicutes constituent la seule classe.

La classification actuelle tient compte dans sa plus grande part des caractéristiques phénotypiques des Mollicutes (tableau I)(67). La taille du génôme, le type respiratoire et les rapports avec les stérols sont les critères taxonomiques majeurs de cette classification. L'habitat constitue parfois un critère de second ordre. Contrairement aux bactéries, la classification des Mollicutes est simple car basée sur peu de caractères.

Le schéma traditionnel de classification des procaryotes a abouti à plusieurs classifications souvent subjectives, créant parfois une certaine confusion.

Le développement spectaculaire de la biologie moléculaire a permis d'établir des relations phylogéniques au sein des diverses espèces, remodelant totalement la classification des Mollicutes (67).

La nouvelle classification tient compte de la structure génomique de chaque espèce.

REGNE : PROCARYOTES

DIVISION : TENERICUTES

CLASSE : MOLLICUTES

ORDRE : 3 ORDRES

I - ORDRE DES MYCOPLASMATALES

- Génôme de petite taille 500 - 1000 mégadaltons (MDa)
strictement exigeants en stérols
- Famille des Mycoplasmatacae 500 MDa
 - . Genre *Mycoplasma* plus de 80 espèces G+C% 22-41
fermentation du glucose, hydrolyse arginine variables
habitat : mammifères-plantes-arthropodes
 - . Genre *Ureaplasma* 3 espèces G+C% 27-30
activité uréasique
habitat : mammifères
- Famille des Spiroplasmatacae 1000 MDa
Formes hélicoïdales pendant la croissance
 - . Genre *Spiroplasma* 10 espèces G+C% 25-31
fermentation glucose, hydrolyse arginine variables
habitat : plantes-arthropodes

II - ORDRE DES ACHOLEPLASMATALES

- Génôme de 1000 MDa
Pas d'exigence en stérols
- Famille des Acholeplasmatacae
 - . Genre *Acholeplasma* 11 espèces G+C% 27-36
habitat : mammifères-plantes-arthropodes

III - ORDRE DES ANAEROPLASMATALES

- Génôme de 1000 MDa
anaérobies stricts
habitat : rumen
exigence variable en stérols
- Famille des Anaeroplasmatacae
 - . Genre *Anaeroplasma* 4 espèces
strictement exigeant en stérols
 - . Genre *Asteroleplasma* 1 espèce
pas d'exigence en stérols

TABLEAU I : CLASSIFICATION ACTUELLE DES MOLLICUTES

A partir du séquençage complet de l'ARN 16S, la comparaison des séquences des diverses espèces prises deux par deux a permis d'établir un pourcentage de similitude. La distance phylogénique calculée à partir de cette valeur permet alors de situer les différentes espèces sur un arbre phylogénique faisant apparaître 5 groupes (figure 1)(67).

Cette méthode d'étude montre que les Mollicutes peuvent être classées en 5 groupes d'espèces distincts à l'intérieur desquels il est possible de définir des sous-groupes (tableau II)(67).

L'origine de ces micro-organismes a longtemps fait l'objet de controverses au sein des taxonomistes.

Pour certains, ils seraient les survivants d'un être unicellulaire primitif, appelé protocaryote, ayant donné naissance au cours de l'évolution aux procaryotes et eucaryotes actuels.

Cette première hypothèse a rapidement été supplantée par une seconde selon laquelle les mollicutes seraient des bactéries dégénérées, en phase d'évolution très rapide dont il reste encore à résoudre l'origine phylétique : groupe cohérent d'origine monophylétique dérivant après analyse de l'ARN 16S et 5S des bactéries à Gram positif à faible G + C % (notamment *Clostridium innocuum*) ou évolution convergente d'origine polyphylétique (67).

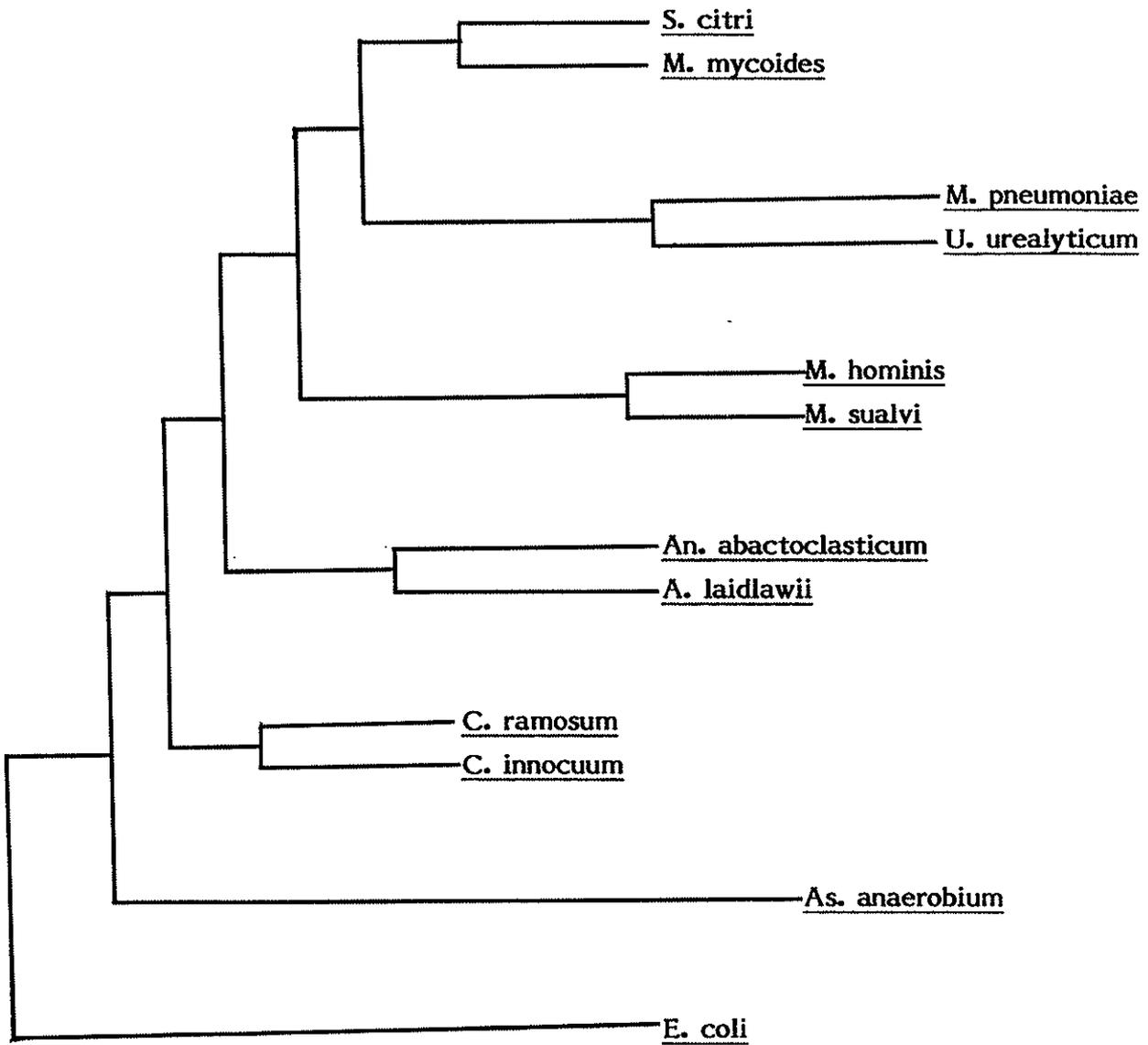


FIGURE 1 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES MOLLICUTES

Groupe PNEUMONIAE

- Mycoplasma pneumoniae*
- M. pirum*
- M. gallisepticum*
- M. muris*
- M. iowae*
- Ureaplasma urealyticum*

Groupe HOMINIS

- Mycoplasma hominis*
- M. orale*
- M. salivarium*
- M. arthritidis*
- M. arginini*
- M. lipophilum*
- M. bovigenitalium*
- M. californicum*
- M. fermentans*
- M. agalactiae*
- M. pulmonis*
- M. sualvi*
- M. mobile*
- M. neurolyticum*
- M. hyopneumoniae*
- M. hyorhinis*

Groupe SPIROPLASMA

- Mycoplasma mycoides*
- M. capricolum*
- M. putrefaciens*
- Acholeplasma florum*
- A. entomophilum*
- M. strain M1*
- M. ellychniae*
- M. sp strain 831-C4*

Spiroplasma citri

S. mirum

S. sp strain DW-1

Spiroplasma apis

S. sp. DU-1

S. sp. MQ-1

S. sp. CN-5

S. sp. TG-1

S. taiwanense CT-1

S. sp. Y32

Groupe ANAEROPLASMA

Acholeplasma laidlawii

A. modicum

Anaeroplasm abactoclasticum

An. intermedium

An. varium

Groupe ASTEROLEPLASMA

Asteroleplasma anaerobium

TABLEAU II : CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE
DES MOLLICUTES

III - PROPRIETES

31- PROPRIETES COMMUNES AUX MYCOPLASMES

Les mycoplasmes diffèrent des bactéries par quelques propriétés mais sont nettement démarquées des virus avec lesquels ils furent longtemps confondus. En effet, il est probable que les mycoplasmes soient de petites bactéries dépourvues de paroi (22).

Le tableau III regroupe les principales propriétés des mycoplasmes.

Le tableau IV permet la comparaison des propriétés des mycoplasmes avec celles d'autres micro-organismes.

311- STRUCTURE

Les mycoplasmes sont les plus petites formes de vie autonome connues : ils mesurent de 125 à 150 nm.

L'absence de paroi caractéristique leur confère un grand pleïomorphisme et l'on est frappé lors de l'examen au microscope électronique par la grande variété des formes : rondes, ovoïdes, filamenteuses, en chapelet... Cette plasticité est favorisée par l'absence de peptidoglycanes au niveau de la membrane (43).

Ces deux caractères structuraux confèrent aux mycoplasmes certaines propriétés :

- caractère filtrable mis en évidence après passage sur membrane.

Cette propriété explique la contamination fréquente des cultures cellulaires par les micro-organismes et bien qu'ils ne soient pas toxiques pour la cellule, ils interfèrent avec les propriétés et la viabilité cellulaire ainsi que sur le développement de l'infection virale,

- PROCARYOTE
- PETIT ET PLEIOMORPHE
- ABSENCE DE PAROI
- NE PREND PAS LA COLORATION DE GRAM
- PETIT GENOME
- PETIT POURCENTAGE DE G+C
- CULTIVE SUR MILIEU ARTIFICIEL
- SE REPRODUIT PAR DIVISION BINAIRE
- METABOLISME PRINCIPALEMENT FERMENTATIF
- TYPE RESPIRATOIRE ANAEROBIE POUR LA PLUPART
- SENSIBLE AUX AGENTS LIPOLYTIQUES
- RESISTANT A LA PENICILLINE
- SENSIBLE AUX ANTICORPS

TABLEAU III : PRINCIPALES PROPRIETES DES MYCOPLASMES

	Mycoplasmes	Chlamydiae	Bactéries	Virus
Présence de paroi (Ac. muramique, Ac. pimélique)	-	+	+	-
Passage à travers les filtres (450 nm)	+	-	-	+
Renferme ADN et ARN	+	+	+	-
Croissance sur milieux acellulaires	+	-	+	-
Nécessité d'une cellule hôte pour la multiplication	-	+	-	+
Besoins en précurseurs d'acides nucléiques	+	+	-	+
Besoins d'un apport d'énergie	-	+	-	+
Besoins en stéroïdes	+ pour la plupart	-	-	-
Croissance inhibée par les anticorps	+	+	-	+
Croissance inhibée par les antibiotiques	+	+	+	-

TABLEAU IV : PROPRIETES DES MYCOPLASMES COMPAREES
A CELLES D'AUTRES MICRO-ORGANISMES

- résistance à certains antibiotiques comme les bêta-lactamines dont la cible est la paroi bactérienne,

- sensibilité à certains paramètres de l'environnement :

- . pression osmotique,
- . pH,
- . agents tensio-actifs,
- . variations de température.

Toutefois, les mycoplasmes possèdent une résistance relative à la congélation et aux chocs osmotiques.

Du fait de l'absence de paroi, les mycoplasmes ne sont séparés de leur environnement que par leur membrane plasmique à trois feuillets dont l'épaisseur varie de 70 à 100 Å. Cette membrane est constituée de (93) :

- Lipides :

- . 30 à 40 %,
- . intramembranaires,
- . phospholipides,
- . acides gras,
- . cholestérol (intra-membranaire) : essentiel pour la fluidité, la stabilité et la croissance (sauf *Acholeplasma*).

- Protéines :

- . 60 à 70 %,
- . ATPase,
- . NADH membranaire uniquement pour *Acholeplasma*. Pour les autres genres, elle est intracytoplasmique,
- . glucosidase, phosphatase et surtout peroxydase.

- Glucides :

- . carbohydrates, surtout extra-membranaires,
- . glycolipides, absents chez *Mycoplasma hominis*,
- . glycoprotéines, extra-membranaires, elles permettraient l'adhérence du micro-organisme aux muqueuses.

Dans le cytoplasme sont retrouvés :

- de l'ADN et de l'ARN de bas poids moléculaire. Ils seront décrits plus loin,
- des plasmides, voire des virus,
- des vacuoles intracytoplasmiques limitées par une membrane,
- des microsomes identiques à ceux des procaryotes.

Les mycoplasmes, du fait de leurs caractéristiques, se comportent comme des bacilles à Gram - vis-à-vis des colorants.

312- GENOME

Le génôme mycoplasmique est une structure majeure qui fait à l'heure actuelle l'objet d'études approfondies.

Non limité par une membrane nucléaire, le génôme est contenu dans la membrane cytoplasmique à laquelle il est étroitement lié.

C'est un ADN bicaténaire, circulaire, mesurant de 5 à 10×10^8 daltons, soit la moitié d'un génôme bactérien : ce sont les plus petites unités vivantes connues douées d'une répllication autonome.

Sa répllication initiée à partir d'un point quelconque de la membrane cytoplasmique, se fait dans une seule direction grâce à une ADN polymérase (37).

Il ne possède pas de mécanismes de réparation : photoréactivité, excision-réparation (19).

Son G + C % est bas, compris entre 23,7 % et 40 % mais le plus souvent inférieur à 30 %. Le faible G + C % serait le fait, pour certains auteurs, des pressions subies par les ancêtres des mycoplasmes au cours de leur évolution (37).

Le génôme des mycoplasmes a fait l'objet de nombreuses études.

L'une d'entre elles, basée sur l'hybridation ADN/ADN, montre des différences d'homologie au sein des génômes de même espèce traduisant l'apparition de sous-groupes. Ces données auraient pu permettre le développement d'une nouvelle classification si la distinction de ces variants n'était pas étroitement liée au type de la sonde utilisée.

DYBIG (37) et INAMINE (55) mettent en évidence au sein des mycoplasmes une hétérogénéité dans l'utilisation de codons de même séquence : pour l'ensemble des espèces, le codon UGA code pour la synthèse du tryptophane alors que pour certaines, il constitue un codon stop et que le codon promoteur est UGG.

CHRISTIANSEN (19) a pu, par hybridation moléculaire, étudier et isoler le ou les opérons (suivant les espèces) codant pour l'ARN ribosomal (ARNr). Ils sont constitués de séquences, séparées par de courts espaces, codant pour l'ARN 16S-5S et 23S et dont les promoteurs sont aussi connus et localisés. La structure commune avec celle des procaryotes est proche, malgré un faible G + C %, de celle de certaines bactéries (*Bacillus*, *Escherichia coli*).

Les séquences codant pour les ARNr n'ont pu être mises en évidence qu'au niveau des génômes de *Mycoplasma mycoides* et *Mycoplasma capricolum*. Indépendantes des opérons codant pour les ARNr et des espaces les séparant, elles présentent aussi pour certaines une structure proche de celle des bactéries vues précédemment.

L'analyse de l'ARNr 16S et d'autres facteurs phénotypiques (37) indique que le génôme des mycoplasmes est soumis à de nombreuses variations génétiques, parfois importantes. Les mécanismes responsables sont nombreux et souvent intriqués :

- conversion et recombinaison,
- transposons,
- absence de mécanisme de réparation de l'ADN,
- conjugaison.

Ces variations touchant préférentiellement, sans que l'on puisse l'expliquer, certaines populations de germes, se traduisent par l'apparition en culture de sous-populations ayant des propriétés différentes des autres colonies.

D'autres structures génétiques, d'origine et fonction variées, sont retrouvées dans la cellule, associées ou non au génôme. Certaines sont utilisées comme "outil génétique" dans l'étude moléculaire des mycoplasmes.

Des virus peuvent infecter les mycoplasmes. Peu connus, ils sont limités le plus souvent à une espèce, voire une lignée de mycoplasmes. Ils présentent peu d'intérêt en tant qu'"outil génétique".

Les plasmides sont souvent difficiles à différencier des virus et ce d'autant plus que certains peuvent s'intégrer au génôme des mycoplasmes. De nombreux plasmides appartenant à des bacilles Gram + peuvent se répliquer dans les mycoplasmes.

Les transposons sont nombreux et l'un d'entre eux le Tn 916 est bien connu. Utilisé comme mutagène, il s'introduit dans le génôme par transformation ou par conjugaison.

313- CONSTITUTION ANTIGENIQUE

Les caractéristiques antigéniques des différentes espèces, voire souches de mycoplasmes, permettent, après obtention d'anticorps spécifiques, de les identifier. Toutefois, l'identification est encore difficile du fait des faibles connaissances actuelles concernant la structure antigénique des mycoplasmes et de l'hétérogénéité existant au sein des souches d'une même espèce. Cette hétérogénéité serait essentiellement due aux antigènes de surface, les antigènes solubles, moins spécifiques présentant une certaine communauté antigénique.

L'étude des antigènes structuraux a permis de distinguer quatre ensembles au sein des mycoplasmes. L'un d'eux regroupe *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasma genitalium*.

Néanmoins, à l'heure actuelle, les mycoplasmes sont surtout différenciés grâce à l'analyse de leur génôme.

314- CULTURE ET CROISSANCE

Les mycoplasmes se développent sur des milieux complexes, synthétiques et acellulaires enrichis en extraits de levure et en sérum (qui ne doit être ni toxique ni souillé) auxquels sont ajoutés des antibactériens et des antifongiques (22).

Ces milieux se présentent soit sous forme liquide soit sous forme solide.

Il n'existe pas actuellement de milieu idéal permettant la culture de tous les mycoplasmes (5).

Les germes sont cultivés en micro-aérophilie (sauf *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasma hominis* qui poussent aussi en aérobiose), à 35-37°C, pH : 7,4-7,6 (sauf *Ureaplasma urealyticum* pH : 6) et en atmosphère humide.

Leur croissance lente est fonction de l'espèce : elle nécessite de trois jours à plus de trois semaines (Tableau V).

L'examen au microscope inversé à faible grossissement permet d'observer sur milieu solide les colonies de mycoplasmes. Hémisphériques et aplaties, elles sont de petite taille, peu visibles à l'oeil nu, mesurant de 10 à 500 μm . Au cours de leur croissance, les colonies peuvent prendre l'aspect caractéristique dit en "oeuf sur le plat" où l'opacité centrale correspond à un enfoncement dans la gélose des colonies et où la périphérie plus claire correspond à des colonies jeunes qui restent localisées à la surface de la gélose (figure 2)(3, 22, 93).

Ces colonies sont à différencier de celles des formes "L", bactéries qui ont perdu leur paroi sous la pression, le plus souvent, d'antibiotiques. Ces bactéries acquièrent alors certaines propriétés des mycoplasmes qu'elles perdent en reversant vers leur forme bactérienne d'origine lors de la disparition de cette pression (3). Le tableau VI permet de comparer les propriétés des mollicutes et des formes "L".

Une cellule de petite taille (0,3 μm) est le point de départ de ces colonies ; il se forme un filament qui s'allonge à la vitesse de 0,5 à 1,7 $\mu\text{m}/\text{mn}$ puis s'étrangle en fin de croissance pour donner une chaîne de cocci. Les divisions du génôme et du cytoplasme peuvent être synchrones donnant un filament puis une chaîne multinuclée de cocci avant de s'individualiser en de simples cellules (3, 22). Le phénomène de division peut débiter à n'importe quel endroit du filament. Le temps de génération varie de 1 à 6 heures suivant les espèces (22).

Ces cultures permettent d'étudier les propriétés biophysiques et biochimiques propres aux mycoplasmes. Elles sont résumées dans le tableau V.

	Marqueurs métaboliques		Mobilité	Réduction du BM	Réduction du TZ	Hémadsorption GR cobaye	Délai apparition des colonies
	Glucose	Arginine					
<i>M. salivarium</i>	-	+	-	-	-	-	2 à 5 jours
<i>M. orale</i>	-	+	-	-	-	-	3 à 10 jours
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	+	+	+	3 à 20 jours
<i>M. laidlawii</i>	+	-	-	-	-	-	1 à 5 jours
<i>M. hominis</i>	-	+	-	-	-	-	1 à 4 jours
<i>M. fermentans</i>	+	+	-	-	-	-	3 à 20 jours
<i>M. genitalium</i>	+	-	-	-	-	-	Lente
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	-	-	-	-	1 à 4 jours

TABLEAU V : PRINCIPAUX CARACTERES DES MYCOPLASMATACEAE
POUVANT ETRE RETROUVES CHEZ L'HOMME

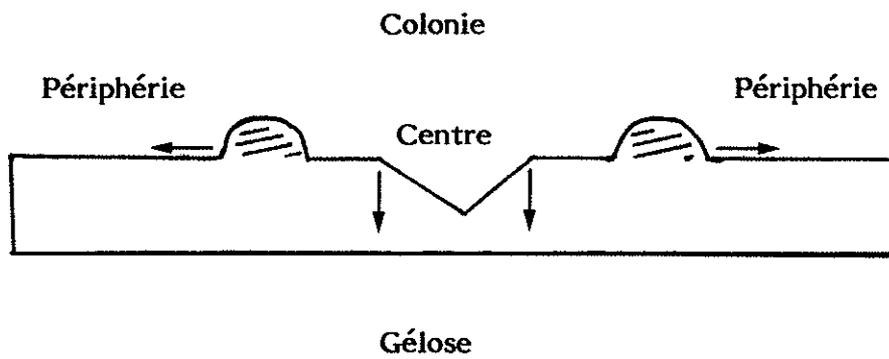


FIGURE 2 : ASPECT EN "OEUF SUR LE PLAT"
D'UNE COLONIE (GELOSE)

	MOLLICUTES	FORMES L
Aspect des colonies	+/- identique (oeuf sur le plat)	
Paroi	Absente	Absente
Précurseurs des peptidoglycanes	Absents	Présents
Protéines de liaison aux pénicillines	Absentes	Présentes
Taille de génôme	inf. 1000 MDa	Sup. 1000 MDa
Réversion	Impossible	Possible
G+C %	22-40	Variable
Sensibilité UV	Très grande	-

TABLEAU VI : COMPARAISON MOLLICUTES - FORMES L

La plupart des mycoplasmes sont immobiles à l'exception de *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis* et *Mycoplasma gallisepticum* (22).

Les propriétés communes aux mycoplasmes sont les suivantes :

- métabolisme fermentatif,
- exigence en substrat énergétique du fait de leur biosynthèse limitée : le glucose ou l'arginine sont les principales sources d'énergie,
- purine, pyrimidine et nucléosides sont indispensables à la synthèse d'acide nucléique,
- cholestérol et acides gras assurent la fluidité et la stabilité membranaires,

Certaines propriétés métaboliques et équipements enzymatiques permettent de différencier les espèces de mycoplasmes :

- hydrolyse de l'urée (pour *Ureaplasma urealyticum*),
- réduction du bleu de méthylène (BM) et des dérivés du tétrazolium (TZ) (pour *Mycoplasma pneumoniae*),
- réduction de l'arginine ou du glucose,
- résistance à l'acétate de thallium,
- présence d'hémolysines,
- production d'exotoxines.

32 - PROPRIETES SPECIFIQUES DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Mycoplasma pneumoniae possède des propriétés spécifiques en plus de celles communes aux autres mycoplasmes.

321- STRUCTURE

Mycoplasma est un organisme filamenteux, de 10 à 200 nm, doué de mobilité par glissement lui permettant de se déplacer rapidement sur les surfaces inertes (3, 13, 22).

Ce micro-organisme, pour assurer sa survie chez l'hôte, s'attache solidement aux cellules animales grâce à une extrémité spécialisée ou tip (visible sous forme d'un noyau dense aux électrons)(13, 39).

La structure de base, responsable de l'adhérence, est une protéine de 168 KDa nommée P1 ou cytoadhésine, projetée à la surface de la membrane comme les peplomers des virus et qui se lie préférentiellement aux glycoprotéines riches en acide neuraminique des cellules hôtes (13, 22, 39).

La protéine P1 est très antigénique et induit la synthèse d'anticorps monoclonaux spécifiques. Ces anticorps inhibent l'adhérence de *Mycoplasma pneumoniae* aux surfaces inertes, sa liaison aux hématies et sa mobilité. Par contre, ils n'interfèrent ni avec sa culture ni avec son métabolisme (39).

La découverte et la caractérisation de cette protéine sont très importantes, laissant envisager la mise au point de nouveaux tests diagnostiques.

322- GENOME

Il possède les caractéristiques communes aux mycoplasmes.

C'est un ADN, circulaire qui mesure 250 μ m et code pour 700 à 800 protéines différentes, dont le poids moléculaire moyen est de 30 000 Da (19).

Il ne possède ni mécanisme de photorésistance, ni mécanisme d'excision-réparation.

Grâce aux techniques décrites par SANGER (97) et BERNET (8) il a pu être séquencé dans son intégralité. Les techniques utilisées sont les suivantes :

- méthode du "plus" et du "moins",
- ribosubstitution,
- dégradation chimique,
- inhibiteur de l'action de l'ADN polymérase,
- plasmide vecteur,
- bactériophage simple brin.

De nombreuses données sur la structure du génôme ont été obtenues :

- comme tous les mycoplasmes il possède un faible G + C %,
- l'homologie de séquence de l'ADN avec celle des autres espèce est inférieure à 5 %, comme le montre le tableau VII (19, 65),
- différentes régions, codant pour des protéines variées, ont été localisées et étudiées :

- . les régions codant pour ARNr 16S, ARNr 5S et ARNr 23S ;
celle codant pour ARNr 16S présente une homologie de 60 % à 70 % avec la région correspondante décrite chez *Mycoplasma capricolum*.

	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. neurolyticum</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. salivarium</i>	<i>A. laidlawii</i>	<i>A. oculusi</i>
<i>M. anatis</i>	—	7	—	—	<2	<2	5	—	—	—	<2	—	<2	<2	<2
<i>M. arginini</i>	5	5	<2	4	10	<2	4	4	5	<2	6	<2	7	<2	<2
<i>M. arthritis</i>	—	3	—	4	5	<2	<2	<2	—	—	5	—	6	<2	<2
<i>M. bovirhinis</i>	100	14	4	7	<2	<2	4	<2	5	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>M. canis</i>	13	100	4	—	<2	<2	5	4	5	<2	<2	<2	3	<2	<2
<i>M. fermentans</i>	5	6	100	8	4	<2	9	7	8	<2	6	<2	3	<2	<2
<i>M. gallinarum</i>	5	7	8	100	<2	<2	17	7	12	<2	<2	<2	5	<2	<2
<i>M. hominis</i>	4	5	<2	5	100	<2	<2	<2	5	<2	6	<2	8	<2	<2
<i>M. hyorhinis</i>	<2	5	<2	4	<2	100	<2	<2	4	<2	<2	<2	3	<2	<2
<i>M. iners</i>	5	6	7	15	<2	<2	100	7	16	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>M. maculosum</i>	4	6	5	8	<2	<2	6	100	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>M. meleagridis</i>	5	5	5	8	13	<2	12	6	100	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>M. neurolyticum</i>	4	4	<2	4	<2	<2	4	<2	4	100	<2	<2	<2	<2	<2
<i>M. orale</i>	4	5	4	4	7	<2	4	<2	5	<2	100	<2	12	<2	<2
<i>M. pneumoniae</i>	<2	<2	<2	—	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	100	<2	<2	<2
<i>M. pulmonis</i>	—	3	—	4	<2	<2	<2	<2	—	<2	<2	—	<2	<2	<2
<i>M. salivarium</i>	<2	6	<2	5	7	<2	4	<2	5	<2	10	<2	100	<2	<2
<i>M. spumans</i>	—	3	—	7	7	<2	4	7	—	<2	5	—	5	<2	<2
<i>A. granularum</i>	—	<2	—	—	—	—	<2	—	—	—	<2	—	<2	16	10
<i>A. laidlawii</i>	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	100	10
<i>A. oculusi</i>	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	14	100

TABLEAU VII : HOMOLOGIE DE SEQUENCE DU DNA ENTRE
 LES DIFFERENTES ESPECES DE MYCOPLASMES
 ET D'ACHOLEPLASMES

- . la région codant pour P1 ou cytoadhésine, bien que connue et répertoriée, présente d'après DALLO (25) une hétérogénéité dans la longueur des fragments de restriction permettant la classification du gène en deux catégories distinctes,
- . COLMAN (21) met en évidence une séquence d'acides aminés, répétitive, différente de celles connues jusqu'à présent, codant pour une protéine de 130 KDa. Elle ne présente aucune homologie avec les séquences des gènes des autres mycoplasmes. Cette séquence se situe près ou dans le gène codant pour P1 au niveau des zones de lecture ouverte. Sa fonction est encore inconnue, mais cette protéine comme P1 est très spécifique de *Mycoplasma pneumoniae*.

De façon plus générale, WENZEL et HERMANN (110, 112) clonent à 90 % en 1988, puis dans son intégralité en 1989 le génôme du *Mycoplasma pneumoniae*, obtenant ainsi :

- 34 cosmides adjacents ou se chevauchant,
- 1 plasmide,
- 2 phages.

La "cartographie" du génôme de *Mycoplasma pneumoniae* est représentée dans la figure 3. Comme le montre ce schéma, le plasmide et les phages lambda permettent de lier certains cosmides adjacents ne possédant pas de séquences communes (absence de chevauchement).

Ces mêmes auteurs, lors de l'étude du génôme, mettent en évidence de nombreuses séquences répétitives (111).

Deux de ces séquences sont étudiées : RepM1 et RepM2 :

- RepM1, constituée de 300 bases, est retrouvée à 10 exemplaires,
- RepM2, constituée de 150 bases, est retrouvée à 8 exemplaires et fait partie du gène codant pour P1.

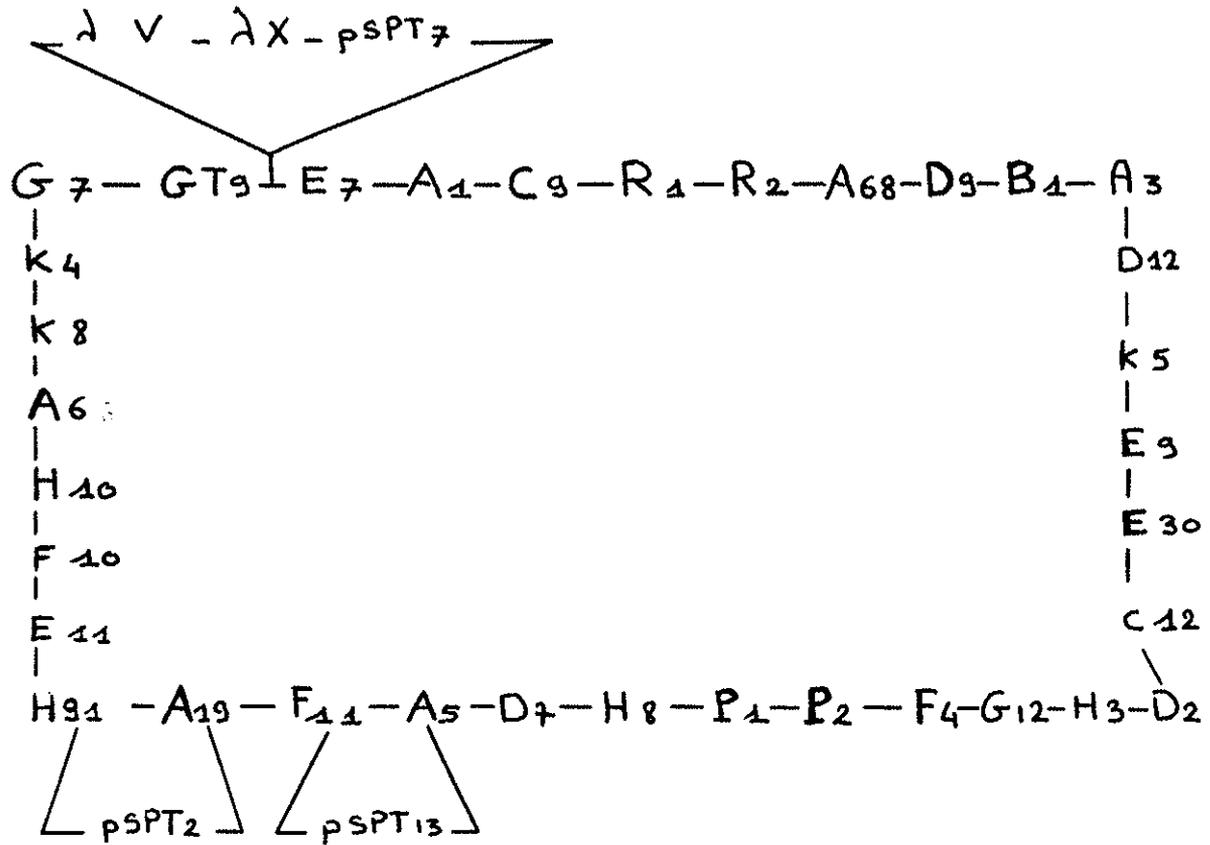


FIGURE 3 : DIAGRAMME SCHEMATIQUE DE LA CARTOGRAPHIE DES COSMIDES.

Ces deux séquences présentent un fort degré d'homologie.

De nombreuses autres séquences répétitives existent disséminées dans le génôme. Elles sont responsables de bruit de fond au cours de l'analyse par hybridation moléculaire (pour minimiser leurs effets, il faudra utiliser des sondes courtes et éliminer au maximum ces séquences).

L'analyse du génôme et l'étude des séquences codant pour des protéines de structures majeures (P1 et protéine de 130 KDa) fournissent un précieux "outil génétique", utilisé dans le développement de méthodes diagnostiques spécifiques et fiables comme les sondes moléculaires et les anticorps monoclonaux.

Toutefois, la fonction de certaines régions, pourtant séquencées, reste encore à déterminer.

323- CONSTITUTION ANTIGENIQUE

La structure antigénique de *Mycoplasma pneumoniae* est à la base de nombreuses études, portant sur ses constituants protéiques, glucidiques et lipidiques. Les composants, cytoplasmiques et membranaires, sont plus ou moins associés entre eux.

Comme les nombreuses analyses effectuées ces dix dernières années le montrent, cette structure est stable.

Certaines données sont d'ores et déjà bien établies. *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasma genitalium* constituent un des quatre ensembles individualisés au sein des mycoplasmes. *Mycoplasma pneumoniae*, contrairement à *Ureaplasma urealyticum* ne possède qu'un sérotype (3) ; il comporte de nombreux épitopes comme l'ont montré les différents anticorps spécifiques obtenus chez l'animal immunisé.

La composition antigénique de *Mycoplasma pneumoniae* repose sur la présence de :

- Protéines

Peu nombreuses (5 à 6), elles sont généralement en position extramembranaire.

La protéine P1 ou cytoadhésine est une protéine de 168 KDa qui permet la liaison du mycoplasme à des sites cellulaires riches en acide neuraminique (39). Bien que très spécifique de *Mycoplasma pneumoniae*, elle peut être responsable de réactions croisées avec *Mycoplasma genitalium* (24, 49). Très immunogène, elle induit la synthèse d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques.

La protéine de 130 KDa : son rôle n'est pas encore défini.

Un polypeptide de 43 KDa : immunogène, il entraîne la synthèse d'anticorps monoclonaux. Détruit par la glutaraldéhyde, son exposition à la surface de la membrane est majorée après un traitement par l'acétone. Spécifique de *Mycoplasma pneumoniae*, son rôle et une éventuelle communauté antigénique avec *Mycoplasma genitalium* restent à démontrer (76).

SASAKI et Coll. (99) décrivent après une étude en immunoblot des protéines de différents poids moléculaires (200 - 170 - 67 et 47 KDa) stimulant la synthèse d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps peuvent reconnaître des protéines de poids moléculaire varié spécifiques de *Mycoplasma genitalium*.

- Hydrates de carbone.

Ils induisent l'apparition d'anticorps pouvant se fixer sur certains épitopes de *Streptococcus pneumoniae* de type 23 et 32. De plus, *Streptococcus pneumoniae* entraîne chez le hamster la synthèse d'anticorps le protégeant d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae* (22).

- Glycolipides

Des glycolipides membranaires associés à une protéine constituent un antigène majeur utilisé dans la réaction de fixation du complément. Ils sont formés en partie de glucose et de galactose, et sont retrouvés disséminés dans la nature. On a pu notamment les mettre en évidence au niveau (22) :

- . de tissus de mammifères,
- . de bactéries,
- . des épinards...

Ce sont les antigènes communs ou CA (Common Antigen). Extraits des épinards, ils sont constitués de diglycéride trigalactosylé et retiennent en réaction de fixation du complément les anticorps dirigés contre les antigènes glycolipidiques de *Mycoplasma pneumoniae* (101).

Ces glycolipides sont responsables (22) :

- . de l'apparition de faux positifs au niveau de certains tests comme celui de Wasserman,
- . de réactions croisées avec d'autres antigènes comme ceux de *Streptococcus MG*,
- . de l'apparition d'agglutinines froides : certains constituants glycolipidiques et glycoprotéiques érythrocytaires (dont l'antigène I) peuvent servir de récepteurs à *Mycoplasma pneumoniae*. Ces récepteurs altérés par les peroxydes mycoplasmiques présenteraient une communauté antigénique avec les glycolipides mycoplasmiques induisant l'apparition d'auto-anticorps (20, 43).

Ce phénomène pourrait aussi intéresser les constituants d'autres organes tels que :

- . les poumons,

- . le tissu cérébral,
- . les muscles lisses,
- . les lymphocytes,

traduisant une antigénicité croisée entre les antigènes mycoplasmiques et ces différents tissus. Mais en dehors de l'hémolyse intra-vasculaire, la pathogénicité de ces auto-anticorps est mal connue.

Ces données antigéniques obtenues après de nombreuses analyses mettent en évidence :

- une protéine majeure ou P1 dont le rôle physio-pathologique et diagnostique est indiscutable,
- de nombreux antigènes de composition variée pouvant présenter des communautés antigéniques avec d'autres micro-organismes voire d'autres substances disséminées dans la nature.
- une hypothèse physiopathogénique expliquant en partie l'apparition des auto-anticorps.

324- CULTURE ET CROISSANCE

Mycoplasma pneumoniae, comme les autres mycoplasmes, se développe sur des milieux synthétiques acellulaires et complexes constitués notamment :

- de sérum d'animaux,
- de cholestérol,
- d'extraits de levures,
- de certains antibiotiques et antifongiques.

Toutefois, il possède certaines propriétés culturales bien définies, facilitant son identification. Ainsi :

- une atmosphère enrichie en CO₂ favorise sa croissance, mais comme *Mycoplasma hominis*, il pousse aussi en aérobiose et en micro-aérophilie (3, 93)

- son temps de génération est en moyenne de six heures et les colonies homogènes et granulaires, apparaissent en trois à vingt jours, pouvant prendre l'aspect caractéristique en "oeuf sur le plat" (3, 22),

- la culture résiste aux bêta-lactamines (du fait de l'absence de paroi) et à l'acétate de thallium permettant sa sélection,

- la fermentation du glucose produit une acidification du milieu, mise en évidence par un indicateur de pH. Il n'utilise ni l'arginine ni l'urée,

- une déshydrogénase réduit les dérivés du tétrazolium et le bleu de méthylène. Ce dernier inhibe la croissance des autres mycoplasmes, fournissant un milieu de culture hautement sélectif. En fait, selon certaines études récentes, il semble que certaines souches de *Mycoplasma pneumoniae* soient, elles aussi, inhibées par la présence du bleu de méthylène (22).

Ces cultures permettent, en outre, de rechercher :

- une hémolyse bêta des hématies de cobaye. Elle apparait en 24 heures traduisant la présence d'une hémolysine,

- une inhibition de la croissance du micro-organisme autour d'un disque de papier imprégné d'un sérum anti-*Mycoplasma pneumoniae*,

- une mobilité par glissement (mouvement circulaire, lent).

D'autres caractères cultureux ont une importance plus relative (22) :

- les solvants lipidiques, la formaldéhyde et certains antiseptiques inhibent la culture du mycoplasme,

- la congélation-décongélation, bien supportée par certaines souches adaptées à la culture en milieu artificiel, gêne l'isolement du germe à partir de produits physiologiques.

Les principaux caractères décrits précédemment permettent après isolement, l'identification de *Mycoplasma pneumoniae* à partir de produits pathologiques.

Le tableau V, précédemment cité, résume en les comparant à d'autres mycoplasmes les principaux caractères de *Mycoplasma pneumoniae*.

IV - POUVOIR PATHOGENE DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE

41- EPIDEMIOLOGIE

Mycoplasma pneumoniae (ou agent d'"Eaton") est l'une des principales causes de pneumopathie atypique primitive.

Il est difficile d'apprécier la fréquence de ce germe du fait de l'importance des formes bénignes par opposition à la rareté des formes sévères. *Mycoplasma pneumoniae* serait responsable de 10 à 30 % des pneumopathies dans les pays industrialisés ; mais du fait de la fréquence de leurs formes bénignes, 70 à 75 % des pneumopathies communautaires ne sont pas étiquetées (81, 115).

Sa répartition est universelle ; toutefois il semble plus fréquent dans les pays tempérés (22, 81). En Europe, les études récentes (115) montrent que les principaux germes responsables de PAP sont *Streptococcus pneumoniae* suivi de *Mycoplasma pneumoniae* puis d'*Haemophilus influenzae* et des virus grippaux qui occupent grossièrement une place équivalente. En Amérique du Nord et en Afrique du Sud, *Mycoplasma pneumoniae* est peu retrouvé (115).

Présent toute l'année, son incidence évolue selon un mode endémique sur lequel s'inscrivent des poussées épidémiques tous les trois à cinq ans (81) ou quatre à sept ans (2, 22, 43) suivant les auteurs. La dernière épidémie en France remonte à Mars 1988 (87). Au cours des deux années qui suivent l'épidémie, la fréquence de l'affection est sensiblement plus faible.

Sa recrudescence automno-hivernale (3, 75, 81, 87) est encore discutée par certains auteurs (22, 43). L'été, *Mycoplasma pneumoniae* peut être responsable de 50 % des pneumopathies.

La tranche d'âge la plus atteinte est celle des 5 à 19 ans, l'infection est rare avant 5 ans et après 40 ans. Toutefois *Mycoplasma pneumoniae* peut atteindre les sujets âgés et les immunodéprimés. En fait, les moins de 5 ans semblent beaucoup plus souvent atteints qu'on ne le pense, comme le montrent deux études (41, 42) résumées dans le tableau VIII et la figure 4. Les formes graves déjà peu fréquentes chez l'adulte (inférieures à 5 %) sont exceptionnelles chez les enfants (43, 83).

L'influence du sexe reste à démontrer. La prédominance est masculine pour certains (22), elle est féminine pour d'autres (42, 43).

La figure 5 représente selon COUCH (22) l'incidence de *Mycoplasma pneumoniae* en fonction de l'âge et du sexe. Quoi qu'il en soit, la prédominance liée au sexe est rarement significative.

L'incidence de l'infection à *Mycoplasma pneumoniae* est étroitement liée à la nature de la population :

- 4 % dans une population civile urbaine (17),
- 15 % voire 35 % ou 40 % dans certaines collectivités en période épidémique (22),
- les mères de famille, âgées de 30 à 39 ans, dont les enfants sont d'âge scolaire, sont aussi fréquemment atteintes (22).

42- TRANSMISSION

Mycoplasma pneumoniae se transmet par voie aérienne, par l'intermédiaire de petites particules d'aérosols ou goutelettes de Pflügge.

Tranches d'âge	Nombre de malades examinés	Nombre de malades infectés (%)
< 1 an	155	24 (15,5 %)
1 à 4 ans	226	53 (23,5 %)
5 à 9 ans	204	86 (42,2 %)
10 à 14 ans	117	41 (35,0 %)
15 à 19 ans	92	29 (31,5 %)
20 à 29 ans	191	50 (26,2 %)
30 à 39 ans	191	37 (19,4 %)
40 à 49 ans	173	28 (16,2 %)
≥ 50 ans	451	47 (10,4 %)

TABLEAU VIII : FREQUENCE DE L'INFECTION A
MYCOPLASMA PNEUMONIAE
SELON L'AGE

(Etude sur 1800 patients dont l'âge était connu
avec précision)

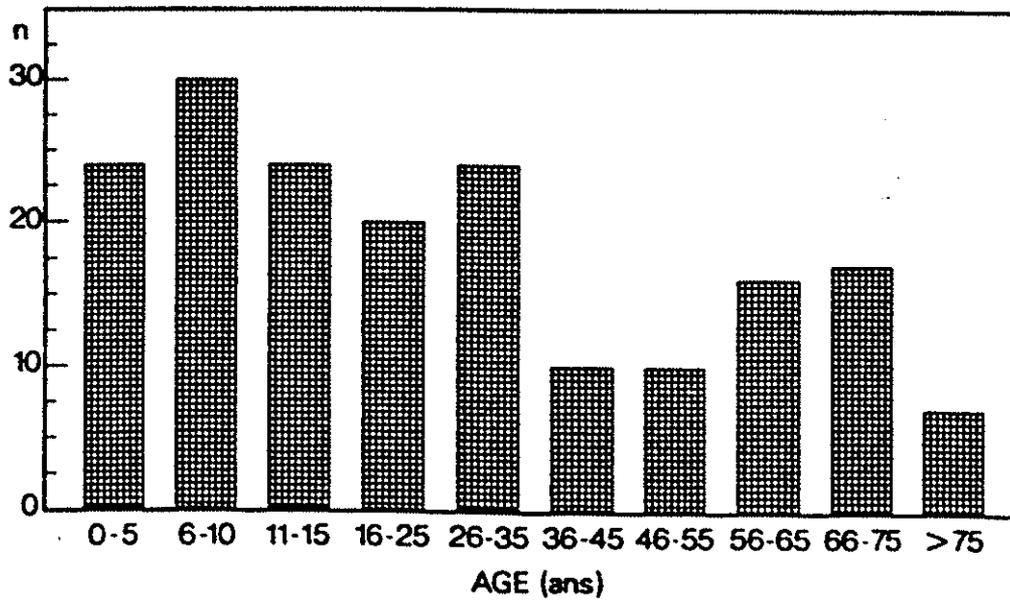


FIGURE 4 : REPARTITION D'AGE DE LA POPULATION AU COURS
D'UNE INFECTION A MYCOPLASMA PNEUMONIAE

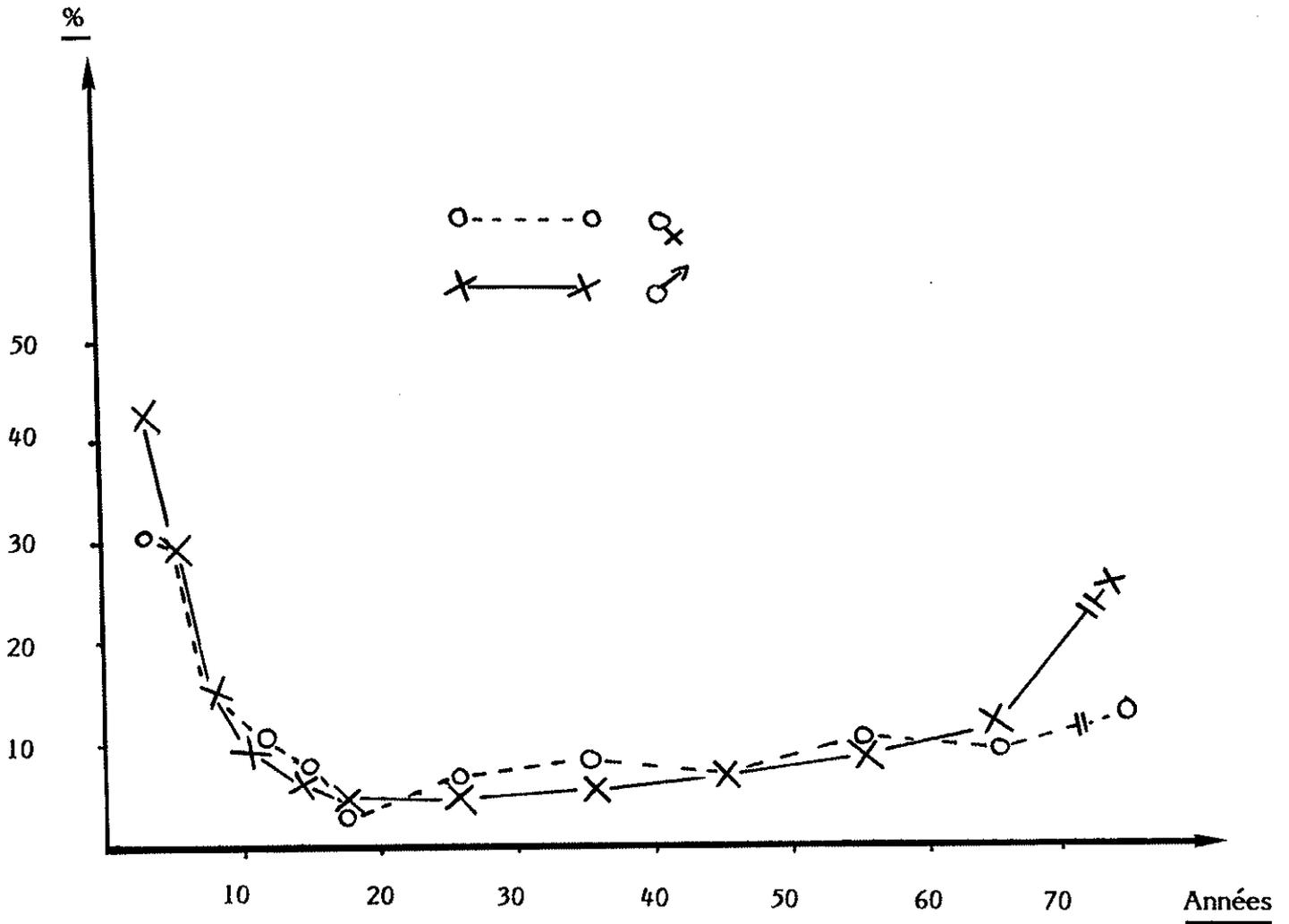


FIGURE 5 : INCIDENCE DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE
SUIVANT L'AGE ET LE SEXE

Peu contagieux, sa diffusion nécessite un contact répété, étroit et prolongé ce qui explique en partie l'importance de l'incidence dans certaines collectivités comme (22) :

- les internats, les casernes,
- les colonies de vacances,
- les garderies,
- les familles,
- les camarades de jeux (plus que les camarades de classe).

La diffusion lente est due à une incubation longue (2 à 3 semaines), mais elle peut dans certaines conditions (contacts répétés, prolongés), être beaucoup plus rapide (22, 75).

La notion de porteur chronique et de porteur sain, discutée, ne peut être exclue devant :

- l'isolement du germe chez des sujets exempts de toute symptomatologie (79, 100, 103),
- des stimulations répétées de l'immunité anti-mycoplasmique au cours de la vie en dehors de toute maladie (22, 100),
- la persistance parfois prolongée de la bactérie au niveau du tractus respiratoire, après l'infection.

43- IMMUNITE

Mycoplasma pneumoniae est un agent infectieux très immunogène qui confère une immunité protectrice dont les caractéristiques sont encore mal connues.

Au cours de l'infection, différents types d'anticorps sont retrouvés :

Anticorps sériques

Différentes classes d'immunoglobulines apparaissent successivement dans le

sang circulant : on retrouve quelques jours après les premiers symptômes, des IgM et IgA, puis secondairement des IgG.

IgM et IgA ne persistent que quelques mois (de 3 à 5) dans le sang. Les IgG elles, sont parfois retrouvées plusieurs années plus tard. Aussi faut-il, pour parler de primo-infection, mettre en évidence la présence d'IgM anti-mycoplasmiques. En effet, une réinfection se traduira le plus souvent par une réascension du titre des IgG.

SILLIS (100) a décrit différents profils immunologiques correspondant à différentes étapes de l'infection :

1) IgM-IgA +/- IgG, présence ou non de signes cliniques : ce tableau pourrait correspondre à une "primo-infection".

2) IgA-IgG sans IgM, présence ou non de signes cliniques : ce tableau peut correspondre :

- soit à une réinfection,
- soit à la persistance du germe au niveau du tractus respiratoire.

Anticorps sécrétoires

Ces immunoglobulines sont retrouvées dans les sécrétions du tractus respiratoire, sous deux formes (22, 40, 106) :

- soit sous forme d'IgA : ces anticorps apparaissent dans les sécrétions naso-pharyngées au décours de l'infection et bien que de demi-vie courte, elles assurent une protection locale efficace en inhibant l'attachement du mycoplasme aux cellules hôtes (51, 106),

- soit sous forme d'IgG : ces anticorps sécrétés en plus faible quantité au niveau de la muqueuse bronchique, apparaissent tard au cours de la maladie.

Des lésions cellulaires limitées, associées à un passage précoce de ces immunoglobulines dans la lumière bronchique, peuvent suffire à faire avorter une infection ou tout au moins se traduire par une symptomatologie limitée (22).

Les anticorps sécrétoires, produits localement, semblent beaucoup plus efficaces dans la protection de l'organisme que les anticorps sériques (40, 58). Ils sont capables non seulement d'inhiber le développement local de l'infection à *Mycoplasma pneumoniae* mais interviennent aussi dans les processus de guérison par l'intermédiaire de différents mécanismes :

- fixation du complément et lyse cellulaire,
- inhibition de la liaison aux cellules hôtes,
- stimulation et facilitation de la phagocytose,
- opsonification du micro-organisme par les polynucléaires et les macrophages, dont l'activité est nettement réduite en l'absence de ces anticorps.

Toutefois, il faut noter que la guérison est généralement longue à obtenir comme en témoigne la persistance de la toux et des anomalies radiologiques.

La durée et l'efficacité de cette immunité ne sont pas encore bien définies. Certains facteurs interviendraient :

Age

L'ensemble des auteurs s'accordent à dire que les "primo-infections" surviennent généralement chez le sujet jeune, voire chez le nourrisson, et que l'adulte est le plus souvent soumis à des réinfections (2, 58). Réinfections se traduisant par l'ascension des IgA et IgG, exceptionnellement par celle des IgM comme le confirme l'évolution avec l'âge du rapport IgM/IgG (100).

Symptomatologie

Pour certains auteurs, une primo-infection symptomatique permet le développement d'une immunité de meilleure qualité associée à une meilleure réponse anamnestic lors de réinfections (22, 40, 100, 106).

Réponse immunitaire

Parfois loin de protéger l'individu, elle peut se traduire par une dysrégulation immunitaire surtout marquée par l'apparition d'auto-anticorps. Ces auto-anticorps, souvent présents, peuvent être responsables d'une symptomatologie clinique variée mais heureusement rare.

Il existerait une susceptibilité individuelle qui reste à démontrer.

44- PATHOGENICITE

Mycoplasma pneumoniae est un hôte inhabituel du tractus respiratoire.

Sa pathogénicité, liée à sa présence, est le résultat de différents mécanismes indépendants ou intriqués :

- soit liés à l'action directe de la bactérie sur les tissus,
- soit intervenant par le biais de mécanismes immunitaires.

441- ACTION DIRECTE DU MICRO-ORGANISME

Mycoplasma pneumoniae est retrouvé dans les sécrétions, deux à huit jours avant l'apparition des symptômes. Sa concentration augmente pour devenir maximale au cours de la phase aiguë de la maladie, puis décroît progressivement après deux à quatre jours, persistant à un taux bas durant une période prolongée pouvant durer parfois 10 à 14 semaines.

Le mode de contamination et les raisons de la prédilection de *Mycoplasma pneumoniae* pour les tissus respiratoires restent encore à éclaircir.

Des études sur culture cellulaire (notamment de trachée de hamster) ont permis d'élucider les mécanismes d'action de la bactérie (13) :

- la bactérie filamenteuse est rarement libre dans l'organisme où seules les souches adhérentes sont virulentes (3, 23),

- elle peut, grâce à une structure terminale ou tip (décrite précédemment), adhérer aux cellules respiratoires superficielles, ce qui lui permet de résister au flux des sécrétions bronchiques et aux mouvements ciliaires d'expulsion (3)(Figure 6),

- de plus, la bactérie peut se déplacer à partir du tip, grâce à un mouvement circulaire de glissement. Cette mobilité lui permet de pénétrer les sécrétions bronchiques, de s'orienter parallèlement aux cils, voire de progresser entre les cellules au sein des couches superficielles (16, 22),

- une fois fixée en position extracellulaire, la bactérie interfère au travers des membranes avec le métabolisme cellulaire, en pompant le cholestérol et les autres nutriments intracellulaires, induisant une déplétion vitale (22) et en instillant des déchets toxiques (3, 16, 23, 43), soit sous forme de H₂O₂ ou produit terminal du métabolisme, soit sous forme de peroxydase ou d'hémolysine inhibant dans la cellule la catalase et la dismutase perpétuant le processus de dégradation,

- ces différents mécanismes sont rapidement responsables d'altérations cellulaires irréversibles (13, 22) :

- . perte de la perméabilité membranaire,
- . altération de l'acide nucléique et du métabolisme énergétique,
- . effet cytopathogène,
- . ciliostase et désorganisation cellulaire,
- . nécrose cellulaire et desquamation des couches superficielles,
- . hémolysine : normalement détruite par les enzymes extracellulaires, elle peut aussi être responsable d'une hémolyse intravasculaire soit par action directe sur les hématies, soit en altérant certains antigènes érythrocytaires (I) favorisant ainsi l'apparition d'auto-anticorps (43).

Ce processus lésionnel, majoré par la réaction inflammatoire et par l'infiltration de polynucléaires, de monocytes et de macrophages (106), se limite le plus souvent à la partie superficielle de l'épithélium trachéo-bronchique respectant l'intégrité du parenchyme pulmonaire.

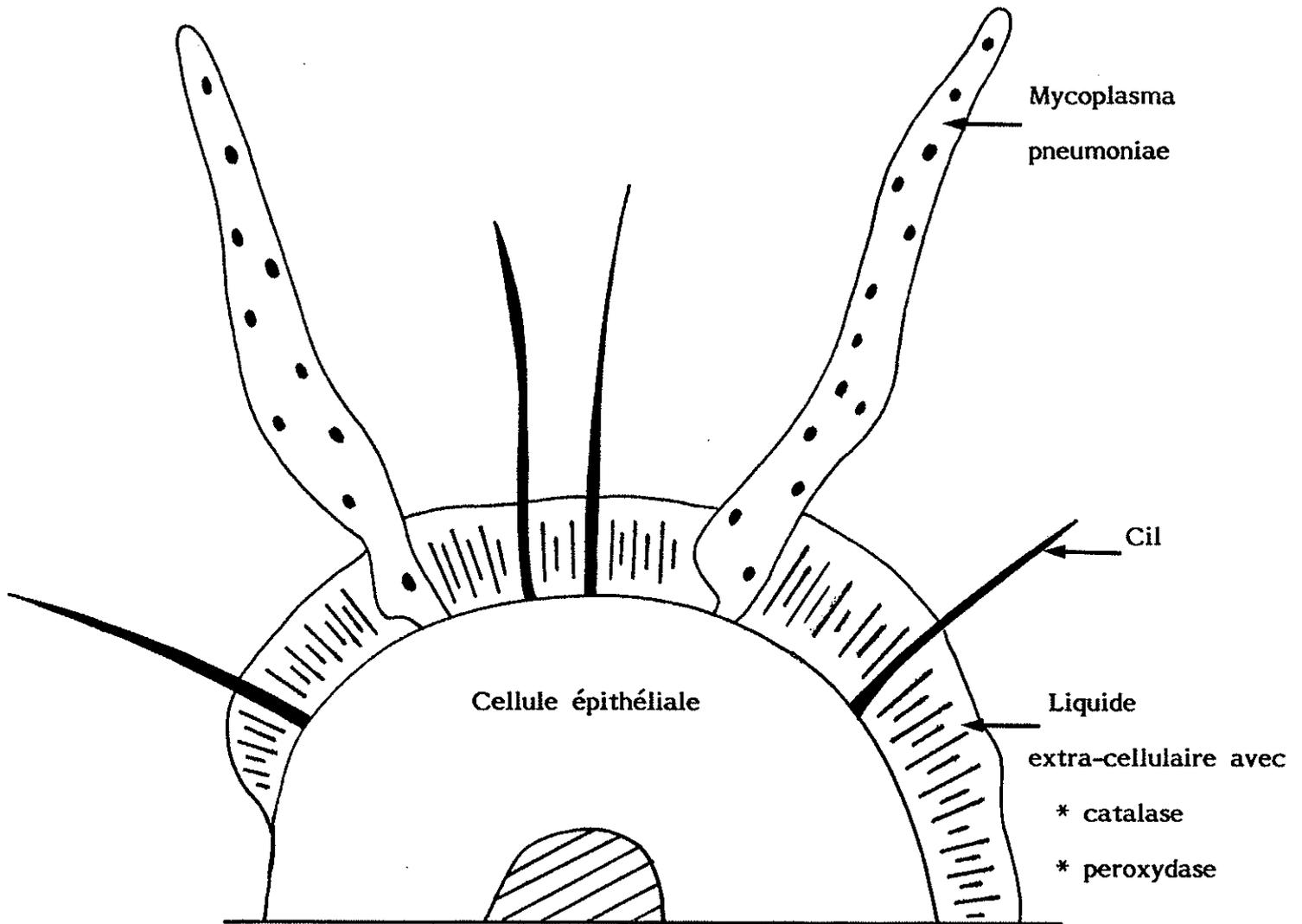


FIGURE 6 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE L'ATTACHEMENT
DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE AUX CELLULES
EPITHELIALES DU TRACTUS RESPIRATOIRE

L'infection à *Mycoplasma pneumoniae* est généralement limitée au tractus respiratoire. Toutefois, il est admis que la bactérie puisse disséminer par voie hémotogène, se localisant au niveau de certains organes, où elle a pu être isolée dans de rares occasions. Les organes les plus fréquemment atteints sont :

- la peau,
- le système nerveux central,
- les articulations et les synoviales,
- le myocarde et le péricarde...

442- ACTION INDIRECTE PAR LE BIAIS DU SYSTEME IMMUNITAIRE

La fréquence des formes bénignes chez l'enfant et l'apparition de complications, surtout chez l'adulte, sont à la base de l'hypothèse selon laquelle les réinfections à *Mycoplasma pneumoniae* entraîneraient des anomalies dans la réponse immune, anomalies qui seraient responsables de l'apparition de certaines complications.

Le mécanisme même de ce phénomène est inconnu, mais il est prouvé que la bactérie intervient dans la régulation de l'immunité par différents mécanismes (16, 36, 43) :

- rôle de mutagène stimulant la réponse proliférative des lymphocytes B et T,
- inhibition de la réponse immunitaire vis-à-vis d'autres antigènes entraînant, entre autre, une anergie tuberculique transitoire (105),
- stimulation de la production d'interféron alpha (phénomène retrouvé dans certaines maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé). Le rôle des cellules NK dans cette stimulation reste à déterminer (84),
- suppression de la réponse blastogénique à certains stimulants antigéniques comme la tuberculine purifiée ou PPD,

- suppression de la production d'interféron gamma due à un déficit temporaire de la fonction lymphocytaire,
- auto-immunité probablement par antigénicité croisée entre la membrane des lymphocytes et celle des cellules de certains tissus comme :
 - . les lymphocytes et les érythrocytes,
 - . les poumons,
 - . le coeur,
 - . le foie,
 - . les reins,
 - . les muscles lisses,
 - . le cerveau,
- apparition d'immuns complexes circulants responsables de lésions au niveau de certains organes (surtout les reins).

Plus que l'action de la bactérie elle-même, l'hypothèse selon laquelle les mécanismes immuns seraient responsables des complications pulmonaires et extrapulmonaires semble se confirmer devant (16, 106) :

- la mise en évidence d'auto-anticorps d'épitopes variés et d'immuns complexes circulants,
- l'absence d'apparition de ces symptômes lors d'un traitement par globulines antithymocytes, par corticoïdes ou par immuno-suppresseurs,
- le temps de latence séparant les premiers symptômes de l'apparition des signes extrapulmonaires.

Mais comme le souligne **CASSEL** (16), les anomalies dans la réponse immunitaire ne se traduisent pas systématiquement par des manifestations cliniques, même si ces anomalies persistent.

443- MYCOPLASME CO-FACTEUR DU VIH ?

Récemment **MONTAGNIER** a mis en relief le rôle des mycoplasmes, agents pathogènes intracellulaires comme cofacteurs du VIH dans le développement du SIDA. L'addition de tétracyclines au milieu de culture cellulaire inhibe l'effet destructeur du virus sans pour autant diminuer la multiplication virale. Cet effet semble dû à la présence d'une souche de mycoplasme infectant en la fragilisant la lignée cellulaire. Cependant, l'extrapolation in vivo de cette observation doit être très prudente. Elle renforce cependant les travaux de **LO** qui, depuis 1986, s'efforce de faire reconnaître comme agent pathogène une nouvelle souche de mycoplasme isolée à partir de culture de cellules infectées par le VIH prélevées sur des sarcomes de Kaposi. Ce mycoplasme nommé *Mycoplasma incognitus* est proche de *Mycoplasma fermentans* isolé parfois du tractus urogénital et peu pathogène chez l'homme (36).

45- MANIFESTATIONS CLINIQUES

Mycoplasma pneumoniae est une des principales étiologies des pneumonies infectieuses aiguës non bactériennes de type pneumopathie atypique primitive (PAP).

Ces pneumopathies peuvent au cours de leur développement se compliquer d'un certain nombre d'autres manifestations cliniques extrapulmonaires. Ces dernières peuvent survenir en dehors de toute affection respiratoire, mais la plus grande prudence s'impose avant d'incriminer *Mycoplasma pneumoniae*, car seul l'isolement du germe peut apporter une preuve incontestable.

451- MANIFESTATIONS RESPIRATOIRES

Les atteintes respiratoires ont été les premières connues, regroupées sous le terme originel de PPLO incluant la notion de pneumopathie.

451-1- CLINIQUE

Trachéo-bronchite

C'est la manifestation clinique la plus commune de l'infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

L'incubation est longue, elle dure de 12 à 14 jours voire 3 semaines.

L'invasion progressive se traduit par un syndrome pseudogrippal : malaise général, fébricule modéré de 38° à 38°5C, frissons, myalgies, arthralgies et céphalées plus fréquentes et plus intenses chez l'adulte. Les manifestations cliniques s'accroissent pendant 2 à 4 jours, pouvant s'associer à un coryza, un enrrouement, une pharyngite ou une otalgie.

Secondairement apparaît la toux, symptôme rapidement dominant traduisant l'irritation de l'épithélium bronchique. Présente dans plus de 90 % des cas, son absence remet en question l'origine mycoplasémique de l'infection (80). C'est une toux tenace, sèche, généralement non productive qui s'accroît progressivement, prenant un aspect permanent, pénible et traînant, pouvant s'associer à des douleurs rétro-sternales majorées par l'inspiration (11).

L'état général est le plus souvent conservé.

L'examen clinique pauvre contraste avec la richesse des signes fonctionnels. On peut retrouver un wheezing plus fréquent chez l'enfant, des ronchi ou des râles humides, un épanchement pleural. Ce dernier, en général peu abondant, est le plus souvent de diagnostic radiologique (59).

D'autres symptômes, associés ou non, sont parfois présents : un coryza, une conjonctivite, une otite inflammatoire, une congestion ou un érythème pharyngé, des adénopathies cervicales antérieures.

Un rash cutané survient parfois plusieurs jours après l'apparition des premiers symptômes.

Pharyngite et rhinite, fréquemment associées à une atteinte des voies respiratoires basses, peuvent se manifester isolément, traduisant une affection locale bénigne (43).

Pneumopathie atypique primitive (PAP)

La PAP est caractéristique de l'infection mycoplasmique.

Bien qu'un faible pourcentage (3 à 10 %) d'infections à *Mycoplasma pneumoniae* évolue vers une pneumopathie (2, 16, 43), de nombreux auteurs s'accordent à dire que 10 à 30 % des pneumopathies communautaires seraient dues à ce micro-organisme.

Rarement brutale, la pneumopathie s'installe en général progressivement, et il est souvent difficile, cliniquement, de la différencier d'une trachéo-bronchite. Seul le cliché thoracique permet de trancher.

La pneumopathie pourrait être un mode de réponse à une réinfection d'un organisme antérieurement sensibilisé par *Mycoplasma pneumoniae* lors d'une infection le plus souvent asymptomatique (45).

Infections respiratoires inapparentes

Fréquentes, elles sont sous-estimées, atteignant plus volontiers les sujets jeunes et surtout les enfants de moins de cinq ans.

451-2- IMAGE RADIOLOGIQUE

Les clichés thoraciques, pratiqués de face et de profil, objectivent (9) :

- soit un foyer broncho-pneumonique :
 - . secondaire à un exsudat alvéolaire,
 - . basal et unilatéral,
 - . parfois associé à une atelectasie.

- Soit un aspect réticulonodulaire :
 - . secondaire à un oedème interstitiel,
 - . diffus et bilatéral.

Le cliché pris en décubitus latéral retrouve dans 25 % des cas un épanchement pleural mineur sans traduction clinique.

Ces anomalies radiologiques ne sont pas pathognomoniques d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

GARO (41), après une étude portant sur 182 patients, constate les mêmes anomalies radiologiques. Elles sont résumées dans le tableau IX.

451-3- ANATOMO-PATHOLOGIE

Le pouvoir pathogène de *Mycoplasma pneumoniae* a pu être étudié expérimentalement chez le hamster, le rat cotton et sur cultures cellulaires de trachées (75). Les lésions mises en évidence grâce à ces modèles expérimentaux reproduisent celles retrouvées chez l'homme lors d'une infection pulmonaire mycoplasmique.

Les lésions sont essentiellement péribronchovasculaires. La fixation rapide de l'agent infectieux sur les cils de l'épithélium bronchique entraîne une diminution de leur mobilité. La muqueuse est hyperhémisée, ulcérée voire nécrosée. Des lymphocytes infiltrent les parois bronchiques, bronchiolaire et vasculaires (75, 106). Les desquamations épithéliales auxquelles peuvent s'associer des exsudats faits d'amas de polynucléaires et de macrophages peuvent provoquer une obstruction de la lumière bronchique puis des atélectasies (75, 80).

Le parenchyme pulmonaire est en général peu atteint en dehors d'un oedème interstitiel et de possibles foyers d'atélectasie (75, 106). Cette localisation limitée aux conduits aériens, plus particulièrement à la trachée et l'intégrité relative du parenchyme pulmonaire, rend compte du caractère le plus souvent bénin de l'infection.

<i>Topographie</i>	<i>Diffuse</i>		<i>Localisée</i>		<i>Epan- chement pleural (n = 27)</i>
	<i>Unilat.</i>	<i>Bilat.</i>	<i>Unilat.</i>	<i>Bilat.</i>	
S. alvéolaire (n = 52)	2	2	47	1	11
S. interstitiel (n = 63)	4	39	17	3	10
S. alvéolo- interstitiel (n = 25)	2	15	7	1	6

3 épanchements pleuraux isolés ; S. : syndrome.

TABLEAU IX : RESUME DES ANOMALIES RADIOLOGIQUES
OBSERVEES AU COURS D'UNE INFECTION
A MYCOPLASMA PNEUMONIAE

451-4- EVOLUTION

Pathologie par définition bénigne, son évolution est le plus souvent lentement favorable. Toutefois, du fait de phénomènes irritatifs, la toux et les anomalies radiologiques persistent en général plusieurs semaines (75, 81).

Néanmoins, l'évolution peut s'émailler :

- de rechutes ou de récurrences (22, 80). Non exceptionnelles, elles surviennent dans l'année voire les semaines qui suivent touchant ou non le même segment pulmonaire,

- de réinfections (80). Favorisées par une primo-infection bénigne ou asymptomatique, elles peuvent se traduire, surtout chez l'adulte, par l'apparition d'un tableau clinique plus grave, parfois associé à des complications,

- de complications (45) : variées mais rares, elles sont parfois favorisées par une "tare" sous jacente telle que la drépanocytose...

- de poussées aiguës d'insuffisance respiratoire (43, 45) survenant sur un terrain d'insuffisance respiratoire chronique (asthme grave, bronchite chronique...).

451-5- COMPLICATIONS

2 à 3 % des infections à *Mycoplasma pneumoniae* peuvent se compliquer, donnant des tableaux cliniques variés parfois intriqués suivant les organes atteints. Plus fréquentes chez l'adulte, elles nécessitent en général une hospitalisation.

Les formes mortelles sont rares survenant dans 0,1 à 3 % des cas selon les études (80).

L'ensemble des auteurs apporte :

1) Des surinfections bactériennes pulmonaires se développant sur un terrain temporairement fragilisé (3).

2) Des complications pulmonaires.

Fréquentes, elles peuvent prendre différentes formes cliniques telles que (16, 22, 43) :

- une pneumopathie bactérienne nécrosante posant alors un difficile problème diagnostique et thérapeutique,
- un épanchement pleural abondant parfois résiduel,
- un abcès, un pneumatocele,
- une lésion pulmonaire extensive,
- une bronchiolite oblitérante.

Parfois responsables de détresses respiratoires gravissimes, elles nécessitent alors une ventilation assistée et une admission en unité de soins intensifs. Ces complications ne sont pas exceptionnelles chez les immunodéprimés (43).

3) Des complications ORL.

Elles touchent surtout les jeunes enfants (80). Ce sont :

- les myringites bulleuses parfois hémorragiques,
- les otites de l'oreille moyenne et les sinusites pouvant se surinfecter.

4) Des complications neurologiques.

Décrites dès 1938, leur origine mycoplasmique n'est reconnue que beaucoup plus tard.

10 % des patients hospitalisés présentent des troubles neurologiques et les sujets de 6 à 21 ans sont plus fréquemment atteints (43).

La physiopathologie de l'atteinte neurologique est mal connue, toutefois différents mécanismes semblent intervenir (1, 45, 75, 103) :

- action directe du micro-organisme (déjà isolé au niveau du LCR) sur le système nerveux,
- réaction auto-immune,
- surinfection virale favorisée par *Mycoplasma pneumoniae*.

Les troubles décrits sont nombreux (22, 79) :

- encéphalite basilaire,
- ataxie cérébelleuse,
- méningo-encéphalite,
- méningite aseptique lymphocytaire,
- thrombose cérébrale,
- mono ou polyradiculonévrite (dont le syndrome de Guillain Barré),
- myélite transverse,
- mononeuropathie (nerf optique, nerf auditif...),
- "psychose toxique".

L'évolution lente (parfois plusieurs mois) n'est pas toujours favorable (43, 79, 103) :

- séquelles neurologiques (dans 30 % des cas),
- rares leuco-encéphalites mortelles.

L'incertitude diagnostique est liée au caractère aspécifique des tableaux cliniques et à l'exceptionnel isolement du germe.

5) Des complications hématologiques.

L'anémie hémolytique est la complication la plus fréquente apparaissant dans les 2 à 3 semaines qui suivent l'infection. Néanmoins, sa traduction clinique est rare (75, 81).

L'origine mycoplasmique de cette hémolyse n'est plus discutée comme le rappellent les nombreux arguments physiopathogéniques décrits précédemment. Toutefois, bien que très suggestive d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*, elle n'en est pas pour autant pathognomonique (75).

Elle s'associe en général à la présence d'agglutinines froides, d'un test de Coombs positif, d'une réticulocytose augmentée...

Les autres complications hématologiques sont beaucoup plus rares (22, 81) :

- CIVD,
- thrombopénie,
- troubles de la coagulation...

6) Des complications cardiaques.

CASSEL (16) en 1981, en répertorie 45 cas dans la littérature médicale. Elles sont de plus en plus souvent diagnostiquées et pourraient toucher 4,5 % des patients (75).

Les troubles électrocardiographiques, en dehors de toute symptomatologie clinique, sont les plus courants (43).

D'autres anomalies ont pu être mises en évidence comme (22, 43, 81) :

- une péricardite,
- un hémopéricarde,
- une insuffisance cardiaque congestive,
- un bloc de branche complet...

Ces troubles cardiaques, parfois graves, peuvent nécessiter une admission en unité de soins intensifs. Les séquelles sont rares.

Les complications seraient liées à l'action directe de la bactérie et au développement d'une auto-immunité.

L'isolement du germe par **NAPHTALIN** (82) dans le liquide péricardique et le sang, obtenu après ponction ventriculaire post-mortem chez un sujet décédé d'une septicémie à *Mycoplasma pneumoniae* permet d'affirmer la responsabilité de ce

dernier dans les manifestations cardiaques. Cependant, même au cours de ces complications, l'isolement du germe au niveau cardiaque reste rare.

7) Des complications cutanéomuqueuses.

Il est parfois difficile de faire la part des atteintes cutanées secondaires à une infection mycoplasmique de celles dues à un traitement souvent associé.

Ces complications sont fréquentes, parfois jusqu'à 25 % des cas.

Différents tableaux cliniques sont décrits (22, 43, 80, 81) :

- érythèmes maculo-papuleux,
 - ulcérations buccales, conjonctivales, génitales,
 - urticaire,
 - érythème noueux,
 - érythème polymorphe mineur ou majeur comme le syndrome de Stevens-Johnson qui est une ectodermose pluri-orificielle.
- MOUTON (81) décrit ce syndrome chez 1,5 % des patients infectés par *Mycoplasma pneumoniae*,
- macules, pétéchies, papulovésicules...
 - STEARE (102) rapporte un cas de purpura rhumatoïde ou maladie de Henoch-Schönlein, chez une jeune fille de 17 ans.

Mycoplasma pneumoniae a exceptionnellement été isolé à partir du liquide de bulles ou de vésicules.

L'ensemble des auteurs s'accorde à reconnaître l'origine immuno-allergique de ces lésions (65)

8) Des complications articulaires.

Bien que prouvées expérimentalement, leur incidence est loin d'être connue.

Les arthralgies sont les manifestations les plus fréquentes, elles sont localisées préférentiellement au niveau des grosses articulations telles que les poignets et les genoux (22).

Les arthrites sont beaucoup plus rares (26).

Néanmoins, *Mycoplasma pneumoniae* a été isolé, après ponction articulaire, chez trois patients présentant des arthrites. Deux d'entre eux étaient hypogammaglobulinémiques (26).

De rares polyarthrites et syndromes de Reiter ont été rapportés.

9) Des complications digestives.

Hépatites : leur fréquence est discutée. Elles se traduisent essentiellement par une augmentation des enzymes hépatiques à laquelle s'associent fréquemment des anticorps anti-muscle lisse (17),

Pancréatite aigue (75) : pouvant apparaître lors de la phase aigüe de la maladie, elle serait secondaire soit à un effet cytopathogène du germe soit à l'action d'anticorps anti-pancréas.

10) Des complications rénales.

Peu fréquentes, elles sont dues à la présence :

- d'auto-anticorps,
- d'immuns complexes circulants,
- de dépôt d'immunoglobulines...

11) Des complications génitales.

Elles sont exceptionnelles. *Mycoplasma pneumoniae* a été isolé chez quatre femmes présentant des infections génitales (dont une développait un abcès tubaire)(16).

452 - MANIFESTATIONS EXTRAPULMONAIRES

Ces manifestations seraient beaucoup plus fréquentes que ce que l'on estime actuellement.

Leurs traductions cliniques, variées et parfois intriquées, sont proches de celles des complications extrapulmonaires décrites précédemment.

Toutefois, elles apparaissent à distance ou en dehors de toute manifestation pulmonaire.

Le micro-organisme est rarement isolé, rendant le diagnostic de certitude aléatoire.

453- CONCLUSION

Mycoplasma pneumoniae est un germe fréquemment pathogène entraînant le plus souvent une symptomatologie bénigne. Son tropisme pour la muqueuse du tractus respiratoire n'est plus à démontrer.

Sans spécificité clinique (en dehors de la toux), ni radiologique, la gravité potentielle, même en l'absence de pathologie sous jacente, doit faire reconsidérer les notions habituelles.

D'après **GAROT** et Coll. (41) les manifestations pneumologiques fréquentes résument le syndrome clinique dans 13 % des cas.

Les mécanismes physiopathologiques sont loin d'être tous connus. Néanmoins, l'action directe du germe et les mécanismes immuns semblent responsables de tout ou partie des anomalies apparaissant au décours de l'infection.

Il convient de rester très prudent quant à l'origine mycoplasmiq ue des manifestations extrapulmonaires. En effet, il est exceptionnel d'isoler le micro-organisme au niveau des organes atteints. Seule l'épidémiologique, la chronologie des évènements cliniques et la biologie apportent des arguments diagnostiques.

V - BASES DU TRAITEMENT

51- TRAITEMENT CURATIF

511- ANTIBIOTIQUES

Les mycoplasmes sont insensibles à tous les antibiotiques inhibant la synthèse des constituants de la paroi bactérienne tels que : les bêta-lactamines, la vancomycine, la bacitracine et la fosfomycine. De même sont inactifs les polymyxines, la rifamycine, les sulfamides, le triméthoprim, le métronidazole, les nitrofuranes et les quinolones. Néanmoins, les nouvelles quinolones (WIN 57 273, fleroxacine, lomefloxacine, ofloxacine...) de plus en plus utilisées devant l'augmentation croissante des résistances des bactéries conventionnelles aux pénicillines et aux tétracyclines, semblent actives sur *Mycoplasma pneumoniae* comme le montre une étude menée par KENNY (64). Leur concentration minimale inhibitrice 90 (CMI90) est supérieure en moyenne à celle des tétracyclines et surtout à celle de l'érythromycine. De plus la détermination de leur sensibilité peut se faire en une semaine avec des CMI90 relativement stables quel que soit l'âge de la culture, alors que celles des tétracyclines et de l'érythromycine demandent en moyenne 14 jours avec des variations parfois importantes des CMI90 suivant l'âge des colonies utilisées.

Les mycoplasmes sont en principe inactivés par les antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse protéique.

Ils sont sensibles au chloramphénicol ; ils le sont de façon plus modérée aux aminosides.

Le traitement de choix repose essentiellement sur l'utilisation des tétracyclines, des macrolides et apparentés (ou MLS) :

- leur efficacité est comparable,

- les tétracyclines actives sur les mycoplasmes, le sont aussi sur la psittacose, la fièvre Q et potentiellement sur *Chlamydia pneumoniae*. Ces molécules restent déconseillées chez la femme enceinte et l'enfant (anomalies du développement dentaire).

Les macrolides, au premier plan desquels l'érythromycine, présentent une concentration sanguine et une diffusion pulmonaire supérieures à celles des tétracyclines. De plus ils ne sont pas soumis aux contre-indications des tétracyclines.

512- INDICATIONS

Erythromycine et tétracyclines sont les traitements de choix. En effet, ils réduisent la durée de l'infection pulmonaire. Néanmoins, leur efficacité sur d'éventuelles complications extrapulmonaires est loin d'être connue.

La cause de la persistance de *Mycoplasma pneumoniae* chez certains patients même après un traitement correctement conduit reste mal comprise (79, 80).

La posologie sera adaptée à l'âge et au poids du patient.

La durée du traitement sera en moyenne de 2 à 3 semaines. Un traitement plus court semble favoriser les rechutes.

Suivant les besoins, un traitement symptomatique pourra être associé (anti-pyrétique, antitussif, anti-inflammatoire non stéroïdien, anti-inflammatoire stéroïdien, oxygène...).

513- EFFICACITE ET SURVEILLANCE DU TRAITEMENT

La recherche de la sensibilité des souches de *Mycoplasma pneumoniae* aux antibiotiques n'est pas classique. En effet (91) :

- les souches résistantes aux MLS et aux tétracyclines sont rares,
- l'antibiogramme classique n'est pas réalisable,
- le germe est rarement isolé,
- la réponse de l'antibiogramme devant l'exigence nutritionnelle, la lenteur de croissance est le plus souvent tardive.

De plus, tous les auteurs ne s'accordent pas sur la définition de la sensibilité et de la résistance.

La méthode utilisée est celle de la dilution en milieu liquide qui permet de déterminer la concentration minimale métabolique (CMM), le résultat de la culture étant jugé sur la variation du pH qu'entraîne l'hydrolyse du glucose.

A défaut d'une standardisation, la mention précise de la composition du milieu et des conditions de culture est indispensable.

De plus la culture en parallèle d'une souche de référence dans les conditions standard et dans les conditions de culture des mycoplasmes permet de relativiser la valeur absolue de la CMM de la souche isolée.

52- PREVENTION

Les méthodes de prévention classique, mis à part l'isolement du patient, sont peu efficaces. L'antiobioprophylaxie est très discutée, elle atténuerait la symptomatologie clinique mais serait inefficace sur l'infection et la dissémination du germe (22, 80).

Les vaccins : développés depuis 1965, différents modèles ont fait l'objet d'études expérimentales et cliniques, jusqu'à présent décevantes (80). On s'oriente actuellement, grâce aux progrès de la génétique, vers des vaccins constitués de fractions antigéniques spécifiques.

Les vaccins inactivés par le formol (3, 22, 80) :

- ces vaccins sont développés dès 1965-1968,
- leur administration induit la synthèse d'anticorps neutralisants.

Néanmoins bien qu'aucun effet secondaire ne soit rapporté, leur pouvoir protecteur est médiocre (30 à 50 %).

Les vaccins vivants atténués (3, 22, 80) :

- ils sont obtenus après passages successifs sur des milieux artificiels,
- utilisables par voie nasale, ils induisent la production d'anticorps locaux protecteurs. Mais le rôle de la réponse immune dans le développement de la maladie et les possibles effets secondaires dus au vaccin en limitent l'intérêt.

Les vaccins constitués de fractions antigéniques (3, 22) :

- à l'étude, ces vaccins sont basés sur l'emploi d'antigènes spécifiques, immunogènes et purifiés, au premier plan desquels la protéine P1,
- on a en effet démontré que ces anticorps orientés contre cette protéine de 168 KDa inhibent l'attachement du micro-organisme aux cellules hôtes, empêchant le développement de l'infection (116). L'emploi comme antigène de cette protéine paraît donc justifié.

DEUXIEME PARTIE : METHODES DE DIAGNOSTIC

Seul l'isolement de *Mycoplasma pneumoniae* à partir de prélèvements dirigés, associé à la présence d'anticorps spécifiques, permet d'affirmer la responsabilité de *Mycoplasma pneumoniae* dans l'affection en cause.

Cependant, ce diagnostic de certitude basé sur des méthodes classiques n'est obtenu qu'en deux à trois semaines. De nombreuses équipes développent actuellement des techniques diagnostiques rapides et fiables, techniques basées sur les propriétés génétiques et antigéniques de *Mycoplasma pneumoniae* désormais mieux connues.

Nous nous proposons donc de passer en revue les différents moyens diagnostiques actuels et futurs d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

I - ANOMALIES BIOLOGIQUES NON SPECIFIQUES

11- SERIQUES

111- LEUCOCYTES

Le taux sanguin des leucocytes est habituellement normal. En effet, il est rare de retrouver des valeurs supérieures à 15 000 voire 10 000 leucocytes par ml (22).

60 à 80 % de ces éléments nucléés sont des polynucléaires neutrophiles.

112- VS ET CRP

Ces deux marqueurs de l'inflammation sont en général fortement perturbés (50) :

- VS supérieure ou égale à 45 mm à la 1ère heure,
- CRP supérieure ou égale à 90 mg/l.

113- ANTICORPS IRREGULIERS

113-1- AGGLUTININES FROIDES

Les agglutinines froides sont retrouvées dans 50 à 70 % des cas, elles sont plus fréquentes dans les formes cliniques sévères (78, 113). Anticorps de type IgM, ils sont dirigés contre les antigènes I des hématies et sont responsables d'anémies hémolytiques généralement infracliniques. Ces anticorps apparaissent en moyenne 7 à 10 jours après le début des manifestations cliniques. Non spécifiques, ils sont également présents au cours d'autres infections (Adenovirus, Haemophilus...).

La détection de ces agglutinines est rapide et permet une bonne orientation diagnostique bien que leur présence ne soit pas pathognomonique d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*. Cette détection peut se faire selon deux techniques (78) :

- une technique standard : le sang mixé avec des hématies de groupe O est incubé 18 heures à + 4°C. Un test positif se traduit par une hémagglutination réversible après réchauffement,

- une variante : un volume de sang mélangé avec un volume de citrate est placé pendant 15 minutes dans la glace puis agité doucement. Si le test est positif, une hémagglutination apparaît, réversible après réchauffement.

Un test positif correspond à un titre en anticorps supérieur au 1/64^{ème}.

113-2- ANTICORPS ANTI-STREPTOCOQUE MG

Présents dans 30 % des infections, ils sont eux aussi plus fréquents lors des atteintes sévères (22). Ces anticorps sont régulièrement associés aux agglutinines froides.

113-3- ANTICORPS ANTI-NOYAUX

Ces anticorps sont rarement mis en évidence (22).

113-4- ANTICORPS ANTI-GLYCOLIPIDES

Ces anticorps sont responsables de faux tests positifs tel que celui de Wasserman.

113-5- TEST DE COOMBS DIRECT

Un test de Coombs direct positif est dû en général à la présence d'agglutinines froides.

12 - FONCTION HEPATIQUE

L'augmentation de la LDH et des ALAT témoigne le plus souvent de sa perturbation (50). La fréquence de ces anomalies est mal connue. Toutefois certaines études font état de 33 à 37 % de bilans perturbés (17, 75).

HOLMBERG (50) définit une équation où interviennent les taux de leucocytes et de LDH. Cette équation permet en fonction de l'âge, de l'épidémiologie et de la symptomatologie, de différencier avec une bonne sensibilité, une infection à *Mycoplasma pneumoniae* d'une infection à *Streptococcus pneumoniae*.

13- FONCTION RENALE

La fonction rénale est respectée en dehors des complications (22).

14- LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN

La ponction lombaire est indispensable quand des troubles neurologiques s'associent au tableau clinique.

Le liquide céphalo-rachidien est clair, parfois trouble, mais rarement hyper-tendu (22). L'examen cyto-bactériologique met habituellement en évidence une lymphocytose ou une pleïocytose le plus souvent modérée au sein d'un liquide aseptique (42, 79). L'étude biochimique peut retrouver une hyperprotéinorachie. La glycorachie est généralement normale, exceptionnellement abaissée (42, 79).

15- OROPHARYNX

Prélèvement et examen direct (après coloration) se résument le plus souvent à la présence de polynucléaires et de lymphocytes au sein d'une flore où aucun organisme ne prédomine (22).

II - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DIRECT

Le diagnostic direct repose sur la mise en évidence du germe ou de l'un de ses constituants à partir d'un produit pathologique, grâce à la culture et/ou à des méthodes diagnostiques rapides.

21- PRELEVEMENTS

Leur nature dépend des signes cliniques associés à la maladie. Du fait de la grande affinité des mycoplasmes pour la membrane cellulaire, il est impératif d'obtenir un grand nombre de cellules infectées, d'effectuer les prélèvements à la phase aiguë de la maladie, et si possible avant toute antibiothérapie (3, 5, 10).

211- TRACTUS RESPIRATOIRE

Il est le site de prélèvement privilégié.

L'écouvillonnage de gorge semble donner pour certains de meilleurs résultats que l'expectoration (5). Mais, bien que n'appartenant pas à la flore commensale, *Mycoplasma pneumoniae* a pu être isolé chez des sujets asymptomatiques (43).

L'expectoration matinale, obtenue par une toux profonde, est différenciée d'un simple crachat salivaire (sans intérêt diagnostic) après l'étude cytologique du prélèvement : nombre de leucocytes, de cellules épithéliales et bronchiques (29).

Le tableau X décrit l'un des systèmes d'évaluation proposés, dans lequel ne sont mis en culture que les échantillons présentant un score de +1 à +3 (7). Plus simplement, si après coloration de Gram on compte plus de 25 cellules épithéliales par champ à l'examen microscopique au faible grossissement quel que soit le nombre de polynucléaires, il est recommandé de demander un autre prélèvement, car il s'agit d'un crachat fortement contaminé par le matériel d'origine oropharyngée, donnant en culture de mauvais résultats (11, 29, 109).

Nature des cellules. Nombre par champ. Expectoration au faible grossissement	Score
10 - 25 polynucléaires neutrophiles	+ 1
Supérieur à 25 polynucléaires neutrophiles	+ 2
Mucus (présence)	+ 1
10 - 25 cellules épithéliales	- 1
Supérieur à 25 cellules épithéliales	- 2

TABEAU X : CRITERES D'EVALUATION DE LA QUALITE DES EXPECTORATIONS.

Le brossage endobronchique et surtout le lavage broncho-alvéolaire sont des prélèvements de meilleure qualité quand ils sont disponibles (6, 10).

Dans les pneumopathies graves, un progrès important a été apporté par les méthodes de prélèvement protégé des sécrétions broncho-alvéolaires (75) :

- la ponction,
- la ponction-aspiration transtrachéale,
- la brosse BFW au décours d'une fibroscopie (ou brosse protégée).

212- LIQUIDES BIOLOGIQUES

Les liquides d'épanchements pleuraux, synoviaux, péricardiques.... sont centrifugés puis le culot riche en cellules estensemencé.

Le LCR et les hémocultures sont rarement mis en culture.

La culture peut s'effectuer aussi à partir du liquide de vésicules ou de bulles cutanées (10).

213- TISSUS

Les biopsies de poumon, de cerveau, de synoviale, de peau... ne doivent pas être broyées mais découpées afin d'éviter la libération d'enzymes et de lysosomes à partir des cellules pouvant provoquer la lyse des mycoplasmes (10).

22- TRANSPORT ET CONSERVATION DES PRELEVEMENTS

L'idéal serait d'ensemencer sur place les milieux de culture (surtout pour les expectorations) ce qui n'est pas toujours possible. Heureusement, des milieux de transport sont disponibles, permettant une meilleure survie du germe (5, 10) : milieux de transport pour bactéries fragiles pouvant servir pour les écouvillons, milieux favorables constitués d'une solution saline tamponnée, de sucrose à 1 %, de lait écrémé en poudre à 6 %, ou d'albumine bovine à 1 %, de pénicilline à 1000 U/ml.

Si l'ensemencement est différé, il est possible de conserver le prélèvement dans certaines conditions (5, 10) :

- soit pendant 24 heures à +4°C,
- soit beaucoup plus longtemps en congelant à -70°C plutôt qu'à -20°C,

tout en gardant présent à l'esprit que la congélation-décongélation inactive une partie des micro-organismes.

23- EXAMEN DIRECT

Du fait de son polymorphisme et de sa petite taille, *Mycoplasma pneumoniae* est difficile à observer au microscope optique.

L'examen direct du prélèvement peut se faire en microscopie à contraste de phase ou en microscopie à fond noir. Toutefois, la reconnaissance du germe est peu spécifique.

Différentes colorations peuvent être utilisées (93) :

- la coloration de Gram : *Mycoplasma pneumoniae* est à Gram - puisque dépourvu de paroi,
- la coloration de Giemsa : elle permet de mieux définir les contours du germe,

- l'immunofluorescence : elle permettrait de localiser autour des cellules infectées et dans leur cytoplasme des filaments fluorescents. En fait, elle est peu utilisée car de sensibilité mal définie.

Ces examens sont peu spécifiques et ne suffisent pas à porter le diagnostic. De plus, ce ne sont pas des examens pratiqués en routine. Leur seul intérêt étant la connaissance partielle de la cytologie et de la flore associée ou non au mycoplasme.

24- DIAGNOSTIC RAPIDE : MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES

Les techniques, disponibles ou futures, sont nombreuses et variées, mais leur but est commun : détecter la présence d'antigènes spécifiques de *Mycoplasma pneumoniae*.

Rapides, de quelques heures à deux jours maximum, elles s'effectuent aussi bien sur des prélèvements que sur des milieux de transport ou des cultures.

Ces techniques sont amenées à évoluer rapidement grâce aux progrès de la génétique et à la possibilité de révéler la présence d'antigènes spécifiques en particulier grâce à des anticorps monoclonaux homologues.

241- IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE (IFD)

Des techniques d'immunofluorescence visant à mettre en évidence *Mycoplasma pneumoniae* dans les prélèvements ont été proposées il y a quelques années, mais les résultats obtenus étaient décevants (3, 6).

Grâce à la connaissance récente des antigènes de *Mycoplasma pneumoniae*, de nouvelles techniques utilisant des anticorps monoclonaux sont à l'étude.

242- CONTRE IMMUNOELECTROPHORESE (CIE)

La contre immunoélectrophorèse est une technique de diagnostic rapide, facile, généralement pratiquée à partir d'expectorations ou de crachats et, plus rarement, à partir d'urine ou de sang. Surtout développée pour le diagnostic d'infection à pneumocoque, son intérêt dans la recherche de *Mycoplasma pneumoniae* est limité bien qu'elle puisse s'appliquer en cours de traitement (103).

243- ELISA

La technique décrite par KOK et Coll. (68) permet de détecter les antigènes mycoplasmiques dans des exsudats respiratoires (aspirations nasopharyngées, expectorations) et des milieux de culture liquide.

Les puits des microplaques sont recouverts d'anticorps polyclonaux de lapin anti-*Mycoplasma pneumoniae* fixant les antigènes présents dans les prélèvements. Ces antigènes fixés sont révélés par des anticorps de lapin anti-mycoplasmiques liés à une peroxydase qui en présence de son substrat chromogénique donne une réaction colorée, traduisant une réaction positive.

C'est une technique :

- sensible dont le seuil de détection est de 10^4 UFC/ml ce qui correspond à peu près à 25 ng/ml de protéines mycoplasmiques et dont l'intensité de la réaction colorée est proportionnelle au nombre d'organismes détectés. Les faux négatifs sont moins fréquents, comparés à la culture,

- spécifique devant l'absence de réaction croisée avec les mycoplasmes saprophytes et avec les bactéries occasionnellement retrouvées dans le tractus respiratoire (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Legionella*, *Candida*, *Pseudomonas*...). Seul *Mycoplasma genitalium* peut interférer avec le test,

- rapide (quelques heures),
- automatisable.

Toutefois, il convient de rester prudent lors de l'interprétation de ce test car :

- les anticorps polyclonaux utilisés, dirigés contre la mosaïque antigénique de *Mycoplasma pneumoniae*, peuvent reconnaître certains antigènes retrouvés chez d'autres micro-organismes. D'après KOK et Coll. l'utilisation d'anticorps monoclonaux entraînerait une baisse de sensibilité du test,
- la sensibilité, importante la première semaine de l'infection, diminue nettement par la suite (présence d'anticorps, antibiothérapie...), passant de plus de 75 % de détection à 58 %.

Aussi, paraît-il souhaitable de l'associer à un autre test diagnostique tel que la détection des IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae*.

244- IMMUNOBLOT

Le test décrit par MADSEN et coll. (77) permet de détecter dans les prélèvements la présence d'une protéine de 43 KDa grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal. Cette protéine est un polypeptide membranaire hautement spécifique de *Mycoplasma pneumoniae*.

Une faible quantité de l'échantillon à examiner est fluidifiée puis soumise à une électrophorèse en gel d'acrylamide. Des protéines prémarquées de haut poids moléculaire permettent de suivre la migration de l'électrophorèse qui, une fois terminée, est transférée sur un gel de nitrocellulose.

Les étapes suivantes permettent de révéler la présence de l'antigène :

- un anticorps monoclonal de type IgG se fixe sur la protéine,
- un antiserum anti-IgG de souris biotinylé se lie à l'anticorps monoclonal,

- un complexe avidine-biotine-peroxydase et son substrat permettent le développement de spots colorés.

Les caractéristiques de ce test sont les suivantes :

- rapidité : permettant un diagnostic en 7 à 8 heures,
- sensibilité : détection de 4 ng/ml de protéines mycoplasmiques,
- spécificité : améliorée par l'utilisation d'un deuxième anticorps monoclonal ou par l'utilisation d'un complexe enzyme-conjugaison-anticorps monoclonal.

Ces anticorps monoclonaux limitent les liaisons non spécifiques des IgG de souris à l'albumine et à certaines fractions des immunoglobulines (chaînes lourdes, chaînes légères, chaînes J),

- possibilité de développer un test permettant, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, de détecter simultanément la présence d'antigènes spécifiques de différents agents infectieux (figure 7).

245- DOT-BLOT (70)

A la différence de la technique précédente, l'échantillon et les témoins contenant l'antigène sont ici déposés sous la forme d'un spot à la surface d'une membrane de nitrocellulose. Des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques sont ajoutés, puis révélés à l'aide d'antiglobulines marquées à la peroxydase. Un test positif se traduit par l'apparition d'un spot coloré. Cette technique rapide (2 heures) permet de détecter 10^4 UFC. Applicable à différents types de prélèvements dont les écouvillons, elle ne présente pas de réaction croisée si ce n'est avec *Mycoplasma genitalium* dont le rôle pathogène reste à démontrer. KOTANI (70) considère qu'il existe une excellente corrélation entre cette technique et la culture.

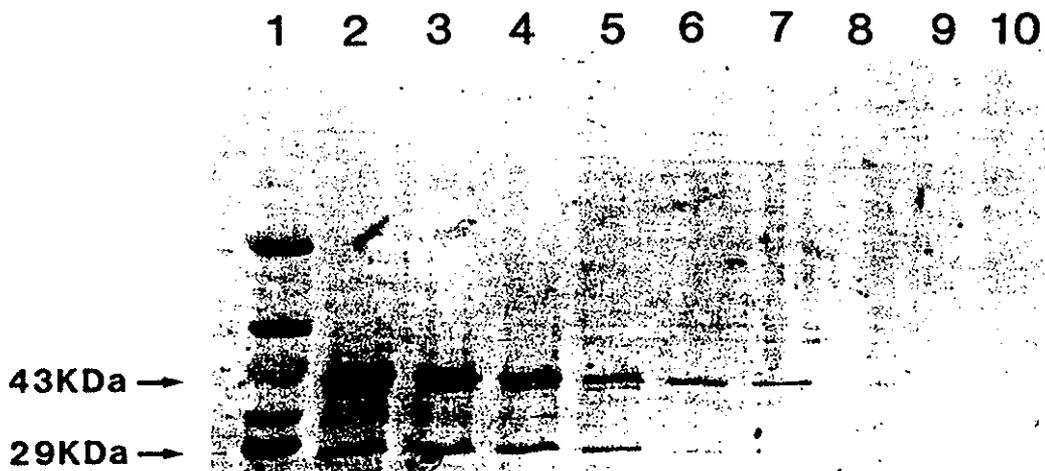


FIGURE 7 : DETECTION SIMULTANEE D'UNE PROTEINE DE 43 KDa
SPECIFIQUE DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE ET D'UN
ANTIGENE DE 29 KDa SPECIFIQUE DE LEGIONELLA
PNEUMOPHILA

Ligne 1 : Protéines de haut poids moléculaire prémarquées,

Lignes 2-9 : dilutions croissantes de l'échantillon,

Ligne 10 : Témoin négatif.

246- HYBRIDATION MOLECULAIRE ET AMPLIFICATION GENIQUE

Mycoplasma pneumoniae est un candidat sérieux à la détection par hybridation moléculaire puisque difficile à cultiver, homogène sur le plan génomique et nettement distinct des autres espèces de mycoplasmes.

246-1- PRINCIPE DE L'HYBRIDATION MOLECULAIRE

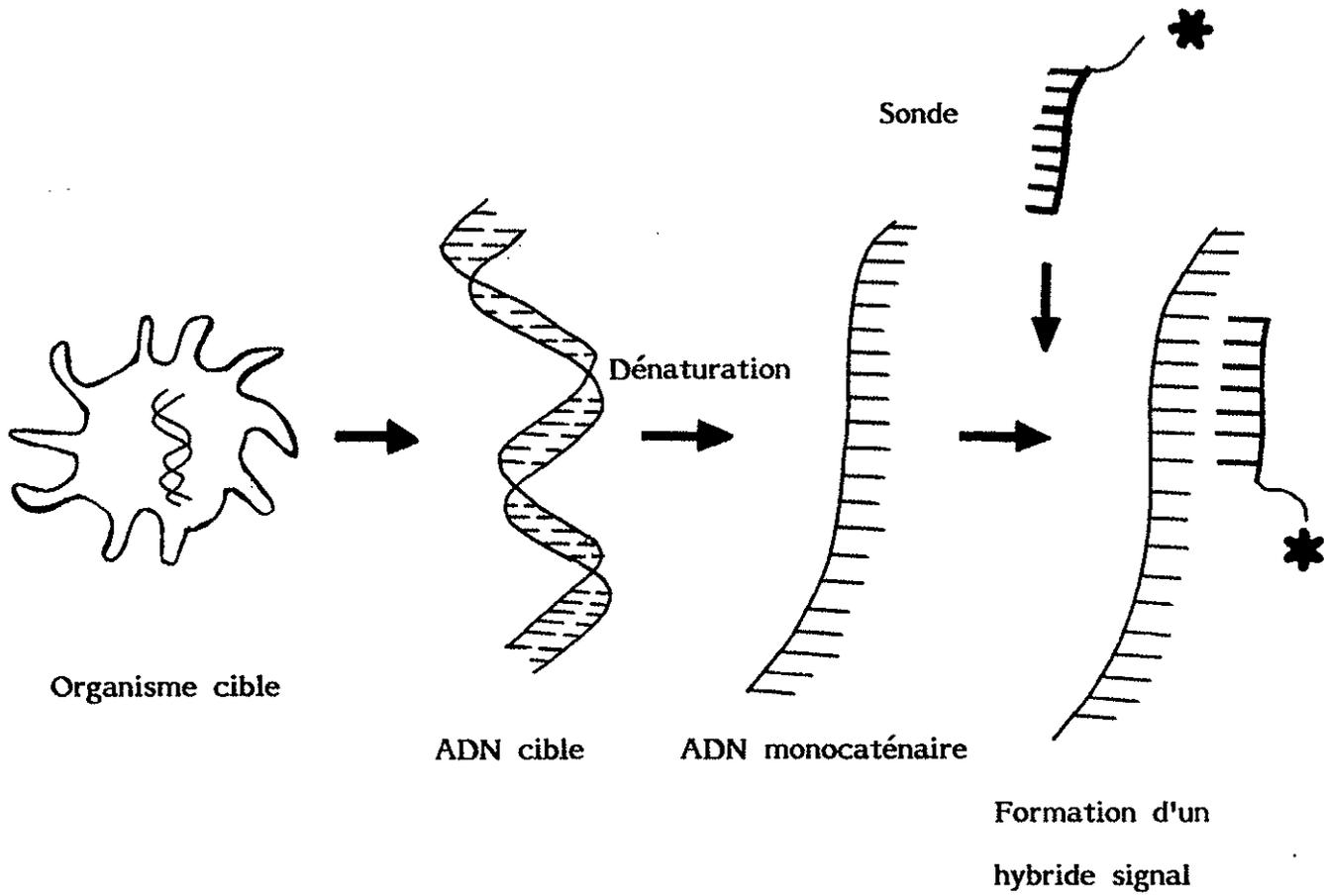
La figure 8 décrit le principe général de l'utilisation des sondes dans le diagnostic biologique.

Les sondes d'acides nucléiques détectent des gènes et non pas, comme dans les méthodes classiques, les substances codées par ces gènes. Chaque espèce vivante possède une séquence nucléotidique spécifique dont la détection permet le diagnostic (94).

L'ADN est une molécule hélicoïdale formée de deux chaînes de sucres phosphates sur lesquels s'articulent des résidus d'adénine (A), de thymine (T), de guanine (G) et de cytosine (C) appelés bases. Ces bases sont liées entre elles (adénine et thymine, guanine et cytosine) par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes. Aussi existe-t-il une complémentarité entre ces quatre résidus. L'ADN peut être dénaturé en deux molécules complémentaires monocaténares (simple brin) par chauffage ou par traitement chimique.

L'ARN se trouve chez les bactéries sous forme monocaténaire : ARN ribosomal, messenger ou de transfert.

Une sonde d'ADN est un fragment d'acide nucléique monocaténaire comportant de 10 à 10 000 bases, marquée d'une manière quelconque, qui peut s'apparier à des portions d'ADN complémentaires préalablement dénaturées, éventuellement présentes dans l'échantillon analysé. Pour cela, les deux brins doivent pouvoir entrer en contact et avoir suffisamment de bases complémentaires contigües pour qu'une molécule bicaténaire stable soit formée, à la manière "d'une fermeture éclair", reconstituant la



**FIGURE 8 : PRINCIPE GENERAL DE L'UTILISATION DES SONDES
DANS LE DIAGNOSTIC.**

structure hélicoïdale primitive (27, 47).

Cette liaison entre molécules complémentaires s'appelle "réaction d'hybridation" (89).

246-2- MOYENS

246-21- Sondes d'acides nucléiques

Le fragment d'ADN qui sert de sonde doit être homogène et pur pour éviter les hybridation parasites.

Les différents types de sondes utilisées sont les suivants :

- Sondes ADN/ADN constituées (28, 89) :

- . de gène entier,
- . de fragment de gène connu, cloné,
- . de fragment de gène prélevé au hasard.

Elles permettent d'étudier la présence de séquences spécifiques complémentaires de la sonde contenues dans le chromosome ou dans le plasmide.

- Sondes ADN/ARN (28) :

- . Les sondes qui s'associent aux ARN ribosomiaux (ARNr) présentent un intérêt particulier. En effet, elles s'associent non seulement avec l'ADN qui donne naissance aux ARNr mais aussi avec les ARNr transcrits un grand nombre de fois dans chaque bactérie développant ainsi un phénomène d'amplification naturel (66, 89, 92),
- . l'adénine de l'ADN s'apparie avec l'uracile de l'ARN.

- Sondes constituées d'oligonucléotides de synthèse (28,89) :
 - . formées de 10 à 40 bases, elles sont spécifiques, stables et faciles à préparer, mais marquées par une seule molécule-signal,
 - . elles sont moins sensibles que les sondes longues classiques (6, 34, 44).

246-22- Marqueurs

Les marqueurs radio-actifs et les sondes "chaudes".

La fixation des marqueurs s'effectue :

- soit par "Nicktranslation" (ou déplacement de césure)(34, 83)(figure 9).
une enzyme appelée DNase I crée des coupures au hasard sur l'un ou l'autre des deux brins d'ADN puis, au niveau de ces coupures une DNA polymérase ôte les nucléotides en les remplaçant par des nucléotides marqués. Sur un oligonucléotide de synthèse, le marquage s'effectue à l'extrémité 5' par la polynucléotide kinase ou en 3' par la désoxynucléotidyl-terminale transférase,
- soit par "random priming" (34, 89). Un ADN monocaténaire est mis en présence d'un mélange d'amorces hexanucléotidiques de séquence aléatoire. Certaines s'hybrident à l'ADN permettant à une ADN polymérase de copier le brin d'ADN à partir de ces amorces, en y intégrant des nucléotides marqués.

Les marqueurs radio-actifs utilisés sont (47):

- iode 125 (I^{125}),
- phosphore 32 (P^{32}),
- soufre 35 (S^{35}),
- parfois tritium 3 (H^3).

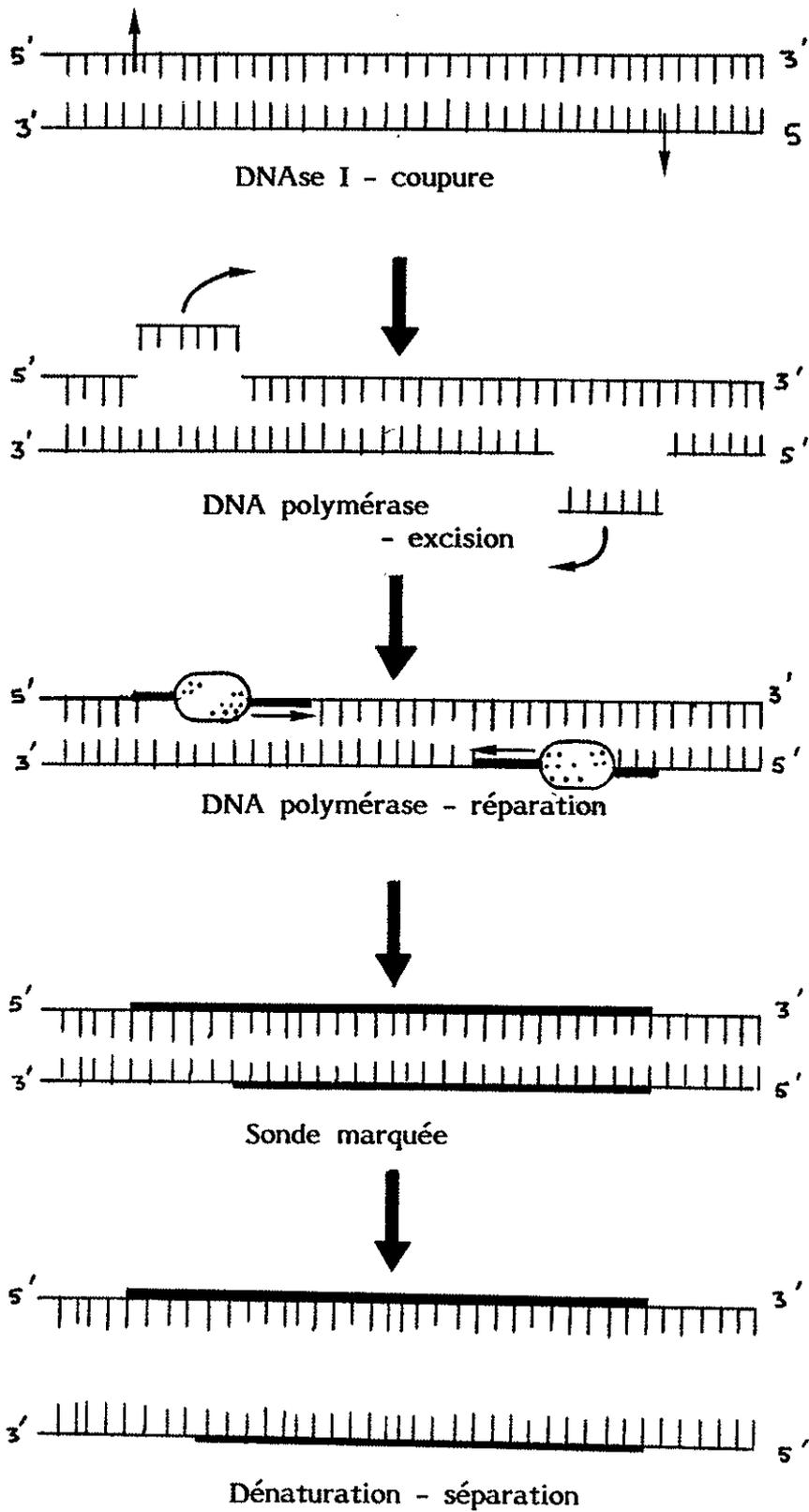


FIGURE 9 : NICK TRANSLATION

La détection se fait :

- soit à l'aide d'un film radiographique,
- soit à l'aide d'un compteur.

Les sondes marquées par des éléments radio-actifs sont les plus sensibles mais leur demi-vie est courte, leur manipulation dangereuse, strictement réglementée et réservée aux laboratoires agréés et leur prix de revient élevé (34).

Les marqueurs non radio-actifs et les "sondes froides".

Les sondes sont modifiées chimiquement ou enzymatiquement, tout en maintenant le plus possible leur capacité à s'hybrider à l'ADN du fait de la présence d'une base modifiée dans la chaîne d'acides nucléiques. Cette base modifiée est détectée par une réaction immunologique de type antigène-anticorps à l'aide d'une seconde molécule ayant une forte affinité pour l'agent modificateur. Cette seconde molécule est elle-même couplée à un système de détection :

- enzyme capable de transformer un substrat incolore, ou un dérivé chromogène ou un système émetteur de photons,
- émission de fluorescence...

Les différents marqueurs non radioactifs utilisés sont résumés dans le tableau XI (34).

- Marquage indirect de la sonde : un groupement chimique introduit dans la sonde est mis en évidence par un système de reconnaissance porteur du signal.
- Marquage direct de la sonde : le marqueur est couplé directement aux acides nucléiques, réduisant au maximum les étapes nécessaires à la détection des hybrides.

Marquage indirect de la sonde

- incorporation de nucléotides modifiés
 - . système biotine-avidine (signal coloré ou luminescent),
 - . analogie de base : 5 bromo-desoxyuridine (signal coloré),
 - . molécule de digoxigénine (signal coloré).

- sans incorporation de nucléotides modifiés
 - . sulfonation directe des résidus cytidyliques (signal coloré),
 - . N-acétoxy-N²-acétylamino-fluorene (résidu guanine-signal coloré).

Marquage direct de la sonde

- enzyme : phosphatase alcaline (signal coloré),
- ester d'acridium (signal luminescent),
- fluorescéine-chélate d'eurobium (signal fluorescent),
- ethidium

TABLEAU XI : LES MARQUEURS NON RADIO-ACTIFS
OU MARQUEURS FROIDS.

Les sondes "froides" sont stables, sans danger et rapides. Toutefois, les molécules biologiques greffées aux sondes pourraient limiter l'appariement et rendre la technique moins sensible. De plus, le bruit de fond lié à la fixation non spécifique des sondes sur les protéines contenues dans l'échantillon contribue à diminuer la sensibilité des sondes "froides" (72).

246-23- Supports physiques et conditions d'hybridation

L'hybridation d'une sonde marquée, sur l'ADN monocaténaire correspondant extrait des bactéries lysées, puis dénaturé (chaleur, alcalis...), s'effectue sur des supports physiques et dans les conditions de stringence optimales définies pour chaque type de sonde (température de dissociation, température d'hybridation, force ionique, agents dénaturant...)(89).

Des supports solides permettent le développement des méthodes suivantes :

- Southern-blot (figure 10) :

les fragments d'ADN obtenus après coupure par une enzyme de restriction, sont séparés par électrophorèse, transférés sur un gel de nitrocellulose, fixés puis marqués par hybridation (34).

- Dot-blot (figure 11) :

méthode plus simple que la précédente : l'échantillon est immobilisé sous forme de point (dot) sur son support, puis hybridé (34).

- Sandwich (figure 12) :

cette méthode utilise deux acides nucléiques différents ayant des séquences communes avec l'ADN à révéler. Un de ces acides nucléiques fixé sur un support sert de réactif capture ; l'autre marqué, sert de réactif signal (89).

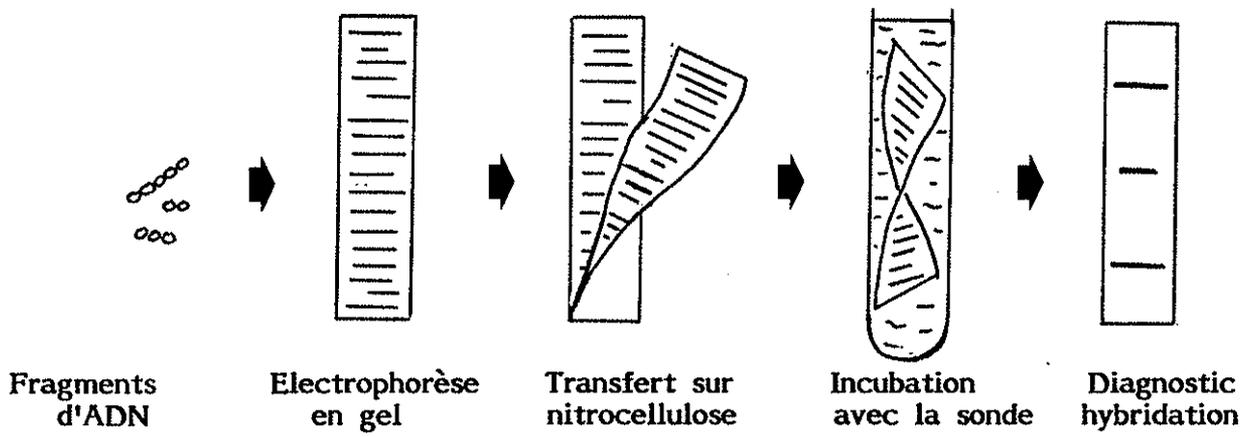


FIGURE 10 : METHODE DE SOUTHERN-BLOT

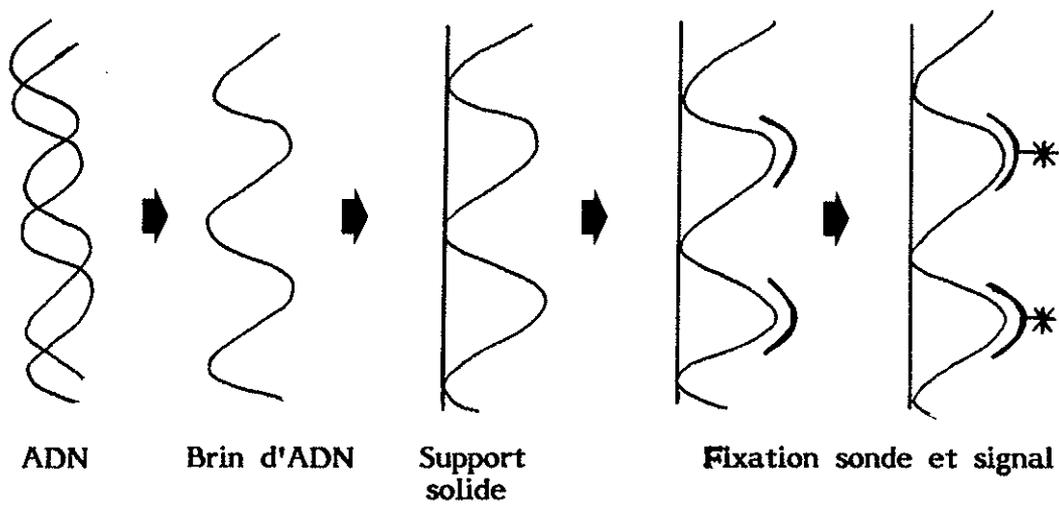


FIGURE 11 : METHODE DE DOT-BLOT

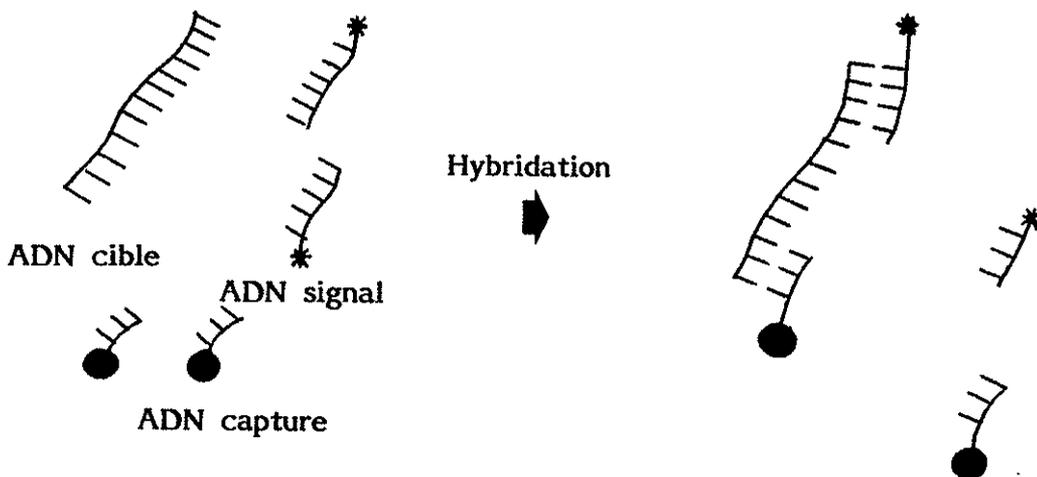


FIGURE 12 : METHODE SANDWICH

- Hybridation in situ :

cette technique permet éventuellement de quantifier des séquences nucléotidiques au niveau de coupes histologiques, la fixation de ces coupes restant une étape critique (34).

Des milieux liquides existent également :

l'ensemble de la technique se réalise dans le même tube. Une fois les hybrides formés, une solution d'hydroxyapatite fixe sélectivement les doubles brins d'acides nucléiques permettant leur isolement (34). Mais cette méthode, bien que plus rapide que celle effectuée sur milieu solide, semble toutefois moins sensible.

246-3- APPLICATIONS ET RESULTATS

RAZIN (92) et HYMAN (54) en utilisant une sonde clonée marquée au P³² ont pu détecter 100 pg d'ADN et environ 10⁵ UFC avec une très bonne spécificité.

Les marqueurs froids (biotinylation et sulfonation) testés par les mêmes auteurs donnent une moins bonne sensibilité de détection et un important bruit de fond dû à des réactions non spécifiques avec des ADN non homologues.

De plus, ces auteurs obtiennent une augmentation non négligeable de la sensibilité en associant à la sonde d'autres séquences spécifiques de *Mycoplasma pneumoniae* et en l'ajoutant en excès dans le milieu de réaction. Cette sonde ne présente aucune réaction croisée avec les autres mycoplasmes dont *Mycoplasma genitalium*.

DULAR (35) a testé une sonde constituée d'ADN complémentaire (ADNc) homologue de l'ARNr de *Mycoplasma pneumoniae*, marquée à l'I¹²⁵ et commercialisée par Gen Probe dont l'hybridation, rapide, s'effectue en milieu liquide. La sensibilité et la spécificité de la sonde comparées à la culture est de 89 %. Les auteurs attribuent en partie les discordances à la faible sensibilité de détection

de la sonde (5×10^4 organismes), qui est donnée par Gen probe comme ayant 100 % de sensibilité par rapport à la culture.

KLEEOMONA (66) a utilisé cette sonde, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, pour détecter la présence de *Mycoplasma pneumoniae* dans des expectorations et des écouvillons de gorge. Si la sensibilité et la spécificité de la sonde concernant les expectorations sont satisfaisantes comparées à la culture et à la sérologie, il n'en est pas de même pour les résultats obtenus à partir des écouvillons : l'écouvillon de gorge ne serait pas représentatif de l'infection pulmonaire basse.

BEBEAR (6) a pu, en utilisant une sonde ADN total biotinylée en dot-blot, détecter 10 pg d'ADN et 10^3 UCC et, par hybridation ADN/ADN sur colonies, visualiser celles-ci à un stade très précoce de la culture. Des réactions croisées apparaissent avec *Mycoplasma genitalium* mais pour une quantité de DNA dix fois supérieure. Cette sonde présente une spécificité moins bonne que celle rapportée pour des sondes clonées ou oligonucléotidiques.

GOBEL (44) a développé les sondes oligonucléotidiques spécifiques complémentaires de régions variables de l'ARN 16S. L'utilisation de ces sondes radioactives en dot-blot a permis de détecter 10^3 mycoplasmes avec une excellente spécificité et une meilleure sensibilité quand l'hybridation est pratiquée sans dégradation préalable de l'ARN et sur des prélèvements frais. *Mycoplasma genitalium* présente des homologies de séquences au niveau des régions variables avec *Mycoplasma pneumoniae*.

Le développement des sondes moléculaires répond au besoin d'une technique rapide, sensible et spécifique permettant le diagnostic de *Mycoplasma pneumoniae*. Néanmoins, cette technique manque encore de sensibilité, est coûteuse et lourde à appliquer en diagnostic courant car elle fait intervenir, le plus souvent, des marqueurs radio-actifs. D'où l'intérêt potentiel de développer des techniques d'amplification permettant d'accroître de façon significative la sensibilité du test diagnostique. Ces techniques d'amplification peuvent faire appel à divers principes :

- l'amplification naturelle, qui consiste à utiliser comme cible un plasmide ou un ARNr représenté par plusieurs dizaines de copies dans la cellule,
- l'amplification du signal après hybridation, qui vise à faire porter par une seule molécule spécifique un maximum de molécules-signal,
- l'amplification génique qui repose sur :
 - . la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR,
 - . la Q B amplification.

246-4- AMPLIFICATION GENIQUE

246-41- Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

La PCR permet la synthèse de milliers de copies d'une séquence spécifique à partir d'un brin d'ADN.

Principe et déroulement de l'amplification (34, 48)(figure 13) :

- le principe de la PCR repose sur la synthèse d'un brin complémentaire d'ADN au moyen d'une ADN polymérase à partir d'une amorce nucléotidique ou "primer" fixée sur le brin d'ADN à copier,
- la PCR se déroule en trois étapes :

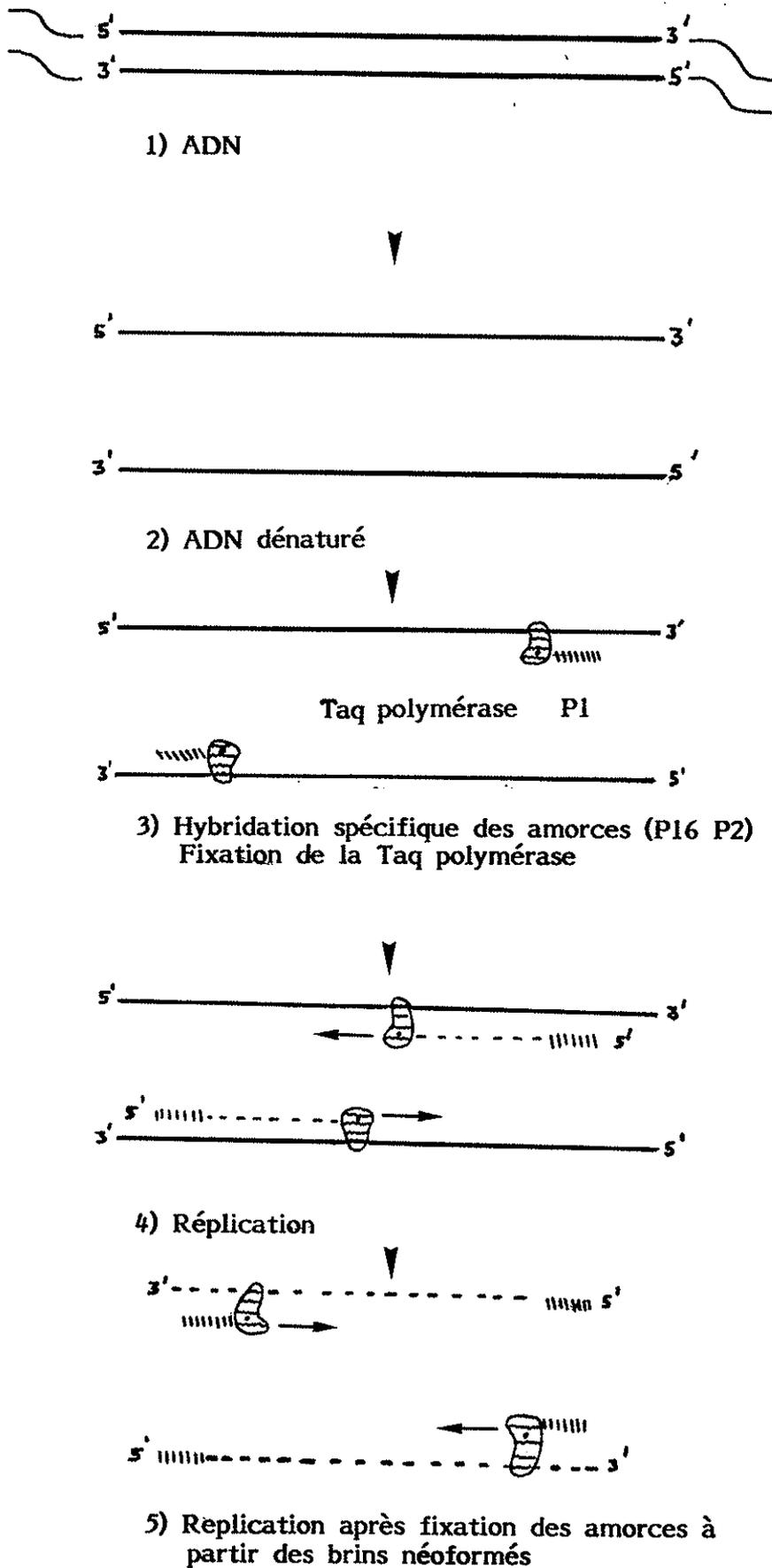


FIGURE 13 : PRINCIPE DE LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE.

- . dénaturation du double brin en simple brin à 95°C,
- . hybridation ou annealing de l'amorce à 45°C,
- . extension par l'ADN polymérase ou Taq polymérase à 72°C,

- deux amorces sont utilisées (P1 et P2) complémentaires chacune d'un des deux brins d'ADN, leur séquence est connue. Ces amorces ne doivent ni être complémentaires ni s'hybrider entre elles. Une des deux amorces se fixe sur le brin d'ADN correspondant. La Taq polymérase synthétise, à partir du primer fixé, l'ADN complémentaire. Au cycle suivant, cette séquence néosynthétisée devient matrice et reçoit l'autre primer à partir duquel une nouvelle synthèse peut débuter. Ainsi, la séquence d'ADN double brin encadrée par P1-P2 sera amplifiée exponentiellement au cours de cycles successifs. L'amorce est à chaque fois intégrée à la partie néosynthétisée.

Les conditions de réactions sont extrêmement contraignantes surtout en début d'amplification afin d'éviter les amplifications non spécifiques. Le facteur limitant est la quantité d'enzymes et d'amorces introduits dans le milieu réactionnel.

La cinétique de la réaction comporte deux phases :

- la courbe d'amplification exponentielle,
- le plateau qui dépend de la quantité d'ADN double brin spécifique disponible dans le milieu.

JENSEN et coll. (59) ont amplifié avec succès l'ADN de *Mycoplasma pneumoniae* à partir d'écouvillons de gorge "fabriqués". Après amplification, les produits sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose et colorés par le bromure d'éthidium afin de les visualiser. Cette technique, plus rapide que l'hybridation, permet de détecter moins de 40 UFC par échantillon.

BERNET et coll. (8) ont amplifié un segment spécifique de 144 paires de bases à partir de faibles quantités d'ADN de *Mycoplasma pneumoniae*. Le produit de la PCR est déposé à la surface d'une membrane de nitrocellulose puis révélé par un marqueur radio-actif. Utilisée en parallèle avec la culture de *Mycoplasma pneumoniae*, la PCR a donné des résultats préliminaires prometteurs :

- détection de 10^2 à 10^3 UFC,
- mise en évidence plus régulière et plus précoce que la culture,
- absence d'influence des inhibiteurs interférant avec la culture.

La PCR, technique très sensible, rapide et théoriquement automatisable, constitue une approche intéressante dans le diagnostic biologique d'infection à *Mycoplasma pneumoniae*. Toutefois, cette technique doit faire ses preuves lors de son application à grande échelle sur des prélèvements biologiques.

246-42 QB amplification

Cette technique utilise les propriétés de l'enzyme de réplication du bactériophage QB : la QB replicase.

Un ARN recombinant s'hybride spécifiquement à l'ADN et peut servir de matrice pour la synthèse d'un grand nombre de copies. Très efficace, la QB replicase permet une amplification de l'ordre du billion (34).

25- CULTURE CELLULAIRE

La culture des mycoplasmes sur système cellulaire s'est rapidement développée après la mise en évidence de ces micro-organismes dans 15 % des cultures de lignée continue.

Les mycoplasmes sont cultivés sur des cellules de mammifères où leur mise en évidence reste difficile. KOHLER (78) résume les différents moyens de détection actuellement disponibles :

- le repiquage sur milieu acellulaire spécifique est peu efficace, certaines espèces (*Mycoplasma hyorhinis*) ne se développant pas dans plus de 60 % des cas. Ce manque de sensibilité serait dû à la présence d'inhibiteurs connus (extraits de levure) ou non,

- les activités spécifiques des mycoplasmes non retrouvées dans les cellules de mammifères :

- . l'activité arginine désaminase, absente chez *Mycoplasma pneumoniae*, ne présente pas d'intérêt,
- . l'activité uridine phosphorylase (UdR-P) catalyse la réaction réversible de transformation de l'uridine en uracil + ribophosphate. Cette activité est détectée après lyse cellulaire et incorporation d'UdR marqué au carbone 14, chromatographie, mesure de la radio-activité émise par l'UdR et l'uracil (U) puis calcul en coups par minute du rapport UdR/U. L'UdR-P est retrouvée dans la majeure partie des espèces mycoplasmiques, mais de nombreux faux positifs existent du fait de sa présence dans les cellules endothéliales, certaines lignées cellulaires d'hépatome, et la culture cellulaire de la *Drosophile*. Une technique de diagnostic rapide est basée sur l'incorporation d'UdR- H^3 et d'U- H^3 dans deux milieux cellulaires distincts, elle permet après calcul du ratio UdR/U d'évoquer ; la présence ou l'absence de mycoplasme. Cette technique peu développée présente de nombreux faux positifs et faux négatifs,

- . l'activité adénosine phosphorylase est un des iso-enzymes les plus commun,
- . des méthodes distinguant le métabolisme de l'acide nucléique des procaryotes de celui des cellules de mammifères, technique peu sensible et peu spécifique,

- des tests de cytotoxicité indirecte. Le 6-méthylpurine-désoxyribose ou 6MPDR est sans action sur les cultures cellulaires exemptes de mycoplasme. La présence de ce dernier induit la transformation du 6MPDR en 6-méthylpurine et en 6-méthylpurine-ribose, métabolite toxique pour les cellules qui sont lysées. Un indicateur de culture cellulaire permet de suivre l'évolution de cet effet cytopathogène. Cette technique spécifique et standardisable peut s'effectuer aussi bien avec le surnageant qu'avec les cellules sur lesquelles sont fixés les mycoplasmes,

- la mise en évidence des mycoplasmes ou de leurs constituants :
 - . la microscopie électronique a permis d'étudier le mode de fixation privilégié de *Mycoplasma pneumoniae* aux récepteurs cellulaires spécifiques. Les autres mycoplasmes, bien qu'en relation étroite, ne sont pas liés aux cellules. Cette technique, précise et sensible, ne peut s'appliquer à un diagnostic de routine,
 - . l'immunofluorescence : le marquage fluorescent de l'ADN appliqué aux cellules non infectées, se traduit par une fluorescence nucléaire contrairement aux cellules infectées où il caractérise par une fluorescence à la fois nucléaire, périmembranaire et cytoplasmique projetée.

L'intérêt de la culture sur système cellulaire dans le diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae* est limité par la présence dans les prélèvements de micro-organismes variés parmi lesquels des mycoplasmes saprophytes.

26 - CULTURE SUR MILIEUX SYNTHETIQUES

Mycoplasma pneumoniae est un micro-organisme exigeant, qui se développe sur des milieux synthétiques, acellulaires, complexes.

261- MILIEUX DE CULTURE

Plusieurs milieux liquides ou gélosés peuvent être utilisés pour la culture de *Mycoplasma pneumoniae*. Ils dérivent du milieu de Hayflick et renferment les éléments suivants (93) :

- un milieu de base ou bouillon, constitué d'une infusion de coeur-cerveau ou de Trypticase soja et de NaCl (0,5 g %), apportant aux mycoplasmes des sels minéraux, des vitamines hydrosolubles, des protéines et des glucides, est enrichi par :

- . de l'extrait de levure (10 %) fraîchement préparé et stérilisé, qui complète l'apport vitaminique (surtout vitamine B) et fournit des acides aminés nucléiques,
- . du sérum (20 %) de veau foetal ou de poulain apportant du cholestérol, des lipides et des protéines. Il doit être frais, non décomplémenté, stérilisé et non toxique,
- . des acides nucléiques en faible quantité. Une partie des besoins en acides nucléiques est déjà assurée par l'extrait de levure,
- . des bases azotées, des acides aminés (L. cysteine...),

- les agents antibactériens et antifongiques sont indispensables à la bonne croissance de *Mycoplasma pneumoniae* en inhibant le développement des autres micro-organismes. En général pénicilline et fungizone sont ajoutées au milieu de culture. Pour les prélèvements très contaminés, on peut ajouter de la polymyxine. L'acétate de thallium, inactif sur les souches de *Mycoplasma pneumoniae*, est

un bon inhibiteur des autres germes,

- un système tampon, constitué de phosphates, assure un pH autour de 7,4-7,8,

- une gélose molle est obtenue après addition au milieu liquide de 0,6 à 0,8 % d'agar purifié ou agar noble.

Pour faciliter l'orientation diagnostique, différents substrats sont ajoutés au milieu de base :

- le glucose (93) hydrolysé par *Mycoplasma pneumoniae* produit des métabolites acides qui modifient le pH du milieu. Un indicateur de pH (le rouge de phenol) permet de suivre son évolution,

- le bleu de méthylène (93,114), réduit par *Mycoplasma pneumoniae*, inhibe la croissance des mycoplasmes saprophytes. Des études récentes ont montré que certaines souches de *Mycoplasma pneumoniae* seraient sensibles à ce substrat.

Plusieurs milieux de culture sont actuellement disponibles . Leur composition respective est détaillée dans le tableau XII.

Le milieu de Hayflick (93) : disponible sous forme de bouillon et de gélose, sa composition est identique au milieu décrit précédemment. Il est possible d'ajouter du glucose et des vitamines MEM.

Le Milieu New York City modifié (MNYCm)(46, 93) : mis au point pour l'isolement de *Neisseria gonorrhoeae*, il s'est révélé adapté à la culture des mycoplasmes. Sa composition est légèrement différente de celle du milieu de Hayflick.

HAYFLICK	MNYC modifié	SP4	PASTEUR
<p><u>Milieu de base</u> <u>Infusion de coeur</u> Eau distillée</p> <p><u>Compléments</u> Sérum de cheval Extrait de levure ADN (thymus) Acétate de thallium Penicilline G +/- Glucose Vitamines MEM</p> <p>pH : 7,8</p> <p><u>Présentation</u> Bouillon Glucose (+ agar)</p>	<p><u>Solution 1</u> Agar Eau distillée</p> <p><u>Solution 2</u> Amidon de maïs Eau distillée</p> <p><u>Solution 3</u> Protéase-peptone Phosphate dipotassique et monopotassique NaCl Eau distillée</p> <p><u>Compléments</u> Sérum de cheval agamma Glucose Dialysat de levure Lincomycine Colistine Amphotéricine Lactate de triméthoprime</p> <p>pH : 7,4</p> <p><u>Présentation</u> Gélase</p>	<p><u>Milieu de base</u> <u>Milieu de base pour</u> mycoplasme Tryptone Peptone Glucose Eau distillée</p> <p><u>Compléments</u> Milieu CMRL 1066 avec Extrait de levure Hydrolysat de levure Sérum veau foetal Pénicilline Rouge de phénol</p> <p>pH : 7 - 7,4</p> <p><u>Présentation</u> Diphasique Gélase</p>	<p><u>Milieu de base</u> Peptone bactériologique Extrait de viande NaCl Supplément minéral</p> <p><u>Compléments</u> Sérum de cheval Extrait de levure Acétate de thallium Glucose Pénicilline Bleu de méthylène Rouge de phénol</p> <p><u>Présentation</u> Bouillon Gélase</p>

TABLEAU XII : COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE.

Il offre deux avantages :

- 1) diminuer le temps d'incubation par rapport aux techniques de culture traditionnelle : 5 à 6 jours pour le MNYCm,
- 2) permettre un examen direct de la culture au microscope grâce à la transparence de sa gélose.

Le milieu SP4 (93, 107) : initialement élaboré pour la culture des spiroplasmales, il est utilisé avec succès dans la culture des mycoplasmes réputés pour leur croissance difficile. Il contient du glucose et du sérum de veau foetal, mais pas d'acétate de thallium. Le milieu SP4 se présente sous forme de gélose et de milieu diphasique. Ce serait actuellement l'un des meilleurs milieux de culture disponible.

Les milieux proposés par Diagnostics Pasteur (30) sont proches du milieu de Hayflick. Ils comprennent en plus du glucose (ainsi que du rouge de phénol), du bleu de méthylène et sont disponibles sous forme de bouillon et de gélose.

D'autres milieux sont disponibles mais ne seront pas décrits dans cette étude.

Ces milieux de culture sont soumis à des contrôles (78, 93) :

- de stérilité : un échantillon est placé à 37°C et en cas de contamination, on assiste à un virage de l'indicateur coloré ou à une augmentation de la turbidité du milieu,
- de fertilité : une souche de *Mycoplasma pneumoniae* est cultivée en parallèle avec un milieu connu qui sert de référence et un milieu test qui renferme le produit à tester. L'attention est surtout portée sur le milieu de base, l'extrait de levure et le sérum.

Ces milieux mis sous vide et placés à +4°C, sont stables et utilisables durant quelques semaines. Une fois sorties de leur emballage, les boîtes doivent être utilisées dans la semaine qui suit.

262- ENSEMENCEMENT ET SURVEILLANCE DES CULTURES

La figure 14 rappelle le principe de l'isolement des souches de *Mycoplasma pneumoniae*.

L'ensemencement est effectué soit à partir du produit pathologique, soit à partir du milieu de transport, sur un milieu gélose et dans un milieu liquide. Les écouvillons sont déchargés dans le bouillon qui est homogénéisé, puis déposé en petite quantité à la surface de la gélose (5, 93). Les autres prélèvements sont ensemencés directement sur la gélose et dans le milieu liquide.

Les milieux de culture sont mis à incuber à 37°C, en atmosphère humide sous 5 % de CO₂ : *Mycoplasma pneumoniae* se développe en aérobiose à la différence des autres mycoplasmes. La présence du CO₂ favorise la primo-culture.

La surveillance quotidienne permet (5) :

- soit de déceler une contamination éventuelle qui se traduit par un trouble du milieu liquide. La culture est ininterprétable et doit être jetée. Toutefois, si l'apparition du trouble est tardive et si l'on suspecte fortement la présence de *Mycoplasma pneumoniae*, le bouillon peut être filtré et réensemencé,

- soit d'observer :

. après au moins 3 jours de culture, le virage (du rouge au jaune) de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu lié à

<p>PRELEVEMENTS</p>	<p>GORGE - CRACHATS - PONCTIONS DE VESICULES LAVAGES BRONCHO-ALVEOLAIRES - LCR - SANG - FRAGMENTS DE TISSUS</p>	
<p>Premier passage sur milieux</p> <p>Conditions de culture</p>	<p><u>Bouillon glucosé</u> pH : 7,4 - 7,8 et T° : 36-37°C</p> <p>Virage en 3 - 7 jours du rouge au jaune</p>	<p><u>Gélose glucosée</u> atmosphère humide</p> <p>4 jours à 3 semaines en atmosphère de CO2 à 5 % à 10 % dans N2</p> <p>Colonies caractéristiques ou granuleuses</p>
<p>Deuxième passage</p>	<p><u>Bouillon glucosé</u> Dans les mêmes conditions</p> <p>Virage de l'indicateur coloré</p>	<p>Géloses ou colonies</p> <p><u>Gélose glucosée</u> Dans les mêmes conditions par technique du "pushing block", ou après homogénéisation en bouillon</p>
<p>Troisième passage éventuel</p>		<p>Typage par</p> <ul style="list-style-type: none"> - propriétés antigéniques - propriétés biochimiques <p>Eventuel antibiogramme</p>

FIGURE 14 : PRINCIPE DE L'ISOLEMENT DES SOUCHES
DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE.

- la fermentation du glucose: le repiquage systématique, précoce, permet alors d'étudier l'aspect des colonies,
- l'apparition, après 5 à 7 jours d'incubation, de petites colonies évocatrices à la surface de la gélose. Ces colonies seront repiquées à partir de la gélose qui sera découpée puis soit homogénéisée dans un milieu liquide, soit retournée puis promenée à la surface d'une gélose vierge (technique du "pushing block")(10).

Les colonies de *Mycoplasma pneumoniae* poussent le plus souvent en 3 à 7 jours. Toutefois les cultures seront conservées trois semaines avant d'être considérées comme étant négatives, certaines souches se développant en 15 à 20 jours (3, 5, 93).

263- IDENTIFICATION

Les colonies se développant sur la gélose sont observées au microscope optique inversé :

- de petite taille (10 à 500 μm), elles sont arrondies, parfois granuleuses, et peuvent prendre l'aspect caractéristique dit "d'oeuf sur le plat" (aspect non pathognomonique puisque retrouvé avec les formes L des bactéries),
- elles apparaissent en violet-mauve après coloration de Dienes. Leur zone centrale est plus fortement colorée que la périphérie. Ces colorants permettent de les différencier de certains artéfacts (micro-colonies cellulaires, zones de dessèchement de la gélose, formations de savons insolubles) et de la plupart des bactéries et des levures qui ne fixent pas ces produits (93).

L'identification et la différenciation de *Mycoplasma pneumoniae* font appel à des critères biochimiques et immunologiques :

- les propriétés biochimiques (tableau XIII)(3, 5, 22) :

- . fermentation du glucose se traduisant par un virage d'un indicateur coloré,
- . absence d'attaque de l'arginine et de l'urée,
- . réduction des dérivés du tetrazolium (TZ)(114),
- . réduction et résistance au bleu de méthylène (résistance qui, nous l'avons vu, est toute relative),
- . hémolyse bêta des globules rouges de cobaye : la gélose est recouverte d'une fine couche d'agar contenant des hématies, l'hémolyse apparaît après une incubation de 1 à 2 jours 37°C et serait due à la production d'une hémolysine par *Mycoplasma pneumoniae*,
- . hémadsorption : la culture recouverte de globules rouges (de différentes espèces) est incubée 30 minutes à 37°C, puis lavée avec précaution ; l'hémadsorption se traduit par la présence de rosaces d'hématies autour des colonies,

- ces propriétés qui ont une valeur d'orientation sont confirmées par une identification antigénique (3, 5, 22, 78) selon les méthodes suivantes :

- . immunofluorescence (IF). En 1957, LIU (74) est le premier à révéler par IF la présence de *Mycoplasma pneumoniae* au sein d'oeufs de poulet embryonnés infectés. Maintenant l'IF est réalisée directement sur la gélose en utilisant un immun sérum anti-*Mycoplasma pneumoniae* de lapin et un immun sérum fluorescent antiglobulines de lapin. C'est une technique simple et spécifique,

	Marqueurs métaboliques			Réduction des dérivés du tétrazolium	Réduction du bleu de méthylène	Hémolyse beta	Hémasorption
	Glucose	Arginine	Urée				
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>M. ovale</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. salivarium</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. laidlawii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. hominis</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. genitalium</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. urealyticum</i>	-	-	++	-	-	-	-
<i>M. fermentans</i>	+	+	-	-	-	-	-

TABLEAU XIII : PROPRIETES DES MYCOPLASMES
DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL.

- agglutination de particules de latex sensibilisées par un immun sérum anti-*Mycoplasma pneumoniae*. Facilement réalisable, les particules sont placées sur une culture en milieu gélosé,
- inhibition de croissance : la souche à identifier est ensemencée en stries sur une gélose, puis un disque de papier buvard imprégné d'immun sérum anti-*Mycoplasma pneumoniae* est déposé sur la gélose. Une réaction positive se traduit par l'absence de croissance autour du disque,
- inhibition métabolique : la présence d'anti sérum anti-*Mycoplasma pneumoniae* inhibe la fermentation du glucose et la réduction des dérivés du TZ (74). L'inhibition de croissance et l'inhibition métabolique sont des propriétés originales des Mollicutes. Mais ce sont des techniques lentes qui nécessitent l'emploi de sérums spécifiques de titre élevé.

En pratique courante, la fermentation du glucose et l'inhibition de croissance par un immun-sérum spécifique suffisent pour affirmer le diagnostic. Si l'on ne dispose pas d'anticorps spécifiques, il est souhaitable d'associer une réaction d'hémolyse ou d'hémadsorption (5).

L'isolement de *Mycoplasma pneumoniae* à partir du tractus respiratoire est un élément de diagnostic positif très significatif car il n'appartient pas à la flore commensale bien qu'il puisse, rarement il est vrai, être retrouvé chez des sujets asymptomatiques. Néanmoins, *Mycoplasma pneumoniae* peut persister pendant 6 à 8 semaines malgré un traitement antibiotique et la présence d'anticorps. Cependant, le nombre de souches isolées restant encore très faible, le diagnostic ne peut être

éliminé en cas d'isolement négatif. En outre, la lourdeur de cette méthode et le long délai nécessaire à l'isolement, limitent son intérêt en pratique courante. Ceci explique l'intérêt du diagnostic sérologique et du développement de nouvelles techniques diagnostiques plus fiables et surtout plus rapides.

III - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE INDIRECT OU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Bien que l'isolement de *Mycoplasma pneumoniae* à partir d'un produit pathologique permette pratiquement d'affirmer sa responsabilité dans l'affection en cause, la sérologie est la méthode diagnostique de loin la plus employée. En outre c'est souvent le seul élément disponible dans le diagnostic des localisations extra-pulmonaires.

Le rôle du micro-organisme dans l'affection peut être confirmé par la présence d'anticorps spécifiques de type IgM, IgA et IgG. Pour être considérée comme positive, la recherche doit montrer un taux d'anticorps spécifiques élevé, ou mieux une ascension significative des taux entre deux prélèvements pratiqués à 2-3 semaines d'intervalle. Cette recherche d'anticorps, plus simple à réaliser que la culture du micro-organisme, est indispensable et doit être associée aux diverses études sérologiques virales effectuées lors de pneumopathies.

Différentes méthodes sont utilisables (43) :

- celles recherchant les anticorps capables d'interférer avec la croissance du mycoplasme in vitro,
- celles utilisant des antigènes inactivés le plus souvent fractionnés.

Quoiqu'il en soit, ces différentes techniques devront être interprétées en tenant compte de différents problèmes non encore résolus :

- . IgM et durée de vie : la détection de ces anticorps plusieurs mois après la phase aiguë limite l'intérêt de certaines techniques,
- . réactions croisées dues à la présence d'antigènes communs à différentes espèces de mycoplasmes (12) voire à d'autres germes,

- auto-immunité, apparaissant notamment au décours des infections extrapulmonaires, avec des auto-anticorps reconnaissant les mêmes antigènes que les anticorps spécifiques,
- différenciation des classes d'anticorps permettant d'établir une chronologie au cours de l'infection mycoplasmique.

Une meilleure connaissance de la structure antigénique de *Mycoplasma pneumoniae* permet actuellement d'envisager le développement rapide de techniques diagnostiques plus fiables et plus performantes.

31- IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

LIU (74) en 1957 a mis au point la première méthode de diagnostic sérologique basée sur l'immunofluorescence. Il a utilisé initialement comme antigène des coupes d'embryons de poulet infectés congelés. Actuellement, d'autres antigènes lui sont préférés (3) : colonies sur gélose mises en évidence par un dispositif d'épifluorescence, micro-organismes fixés sur lame, obtenus après centrifugation de cultures en milieu liquide.

Cette technique spécifique et sensible est d'interprétation délicate du fait de la petite taille et du pléiomorphisme du micro-organisme. Une réaction positive se traduit le plus souvent par un amas fluorescent dans lequel il est difficile de distinguer les micro-organismes des artéfacts fluorescents (3).

L'IFI est aussi sensible que la culture et la réaction de fixation du complément tout en étant beaucoup plus rapide (15). Il est possible de déterminer le titre en anticorps du sérum. On peut également, en utilisant des anti-sérums marqués spécifiques, différencier les classes d'immunoglobulines (3, 15).

L'IFI ne présente pas en général de réaction croisée avec d'autres micro-organismes comme *Légionella pneumophila* (32).

L'IFI possède de nombreux avantages ; toutefois elle nécessite un équipement élaboré et des opérateurs entraînés. Cette technique subjective dans son interprétation est peu adaptée aux grandes séries.

32- REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT (RFC)

La RFC développée en 1962 par **CHANOCK** (18) puis en 1965 par **KENNY** (62) utilisait comme antigène une substance extraite d'agents responsables de PPLO à l'aide de solvants organiques. Cet antigène à forte composante lipidique comme le montre ses propriétés (extraction par le chloro-méthanol, solubilité dans les solvants organiques) possède, quand il est brut, une forte activité anticomplémentaire. Cette dernière est nettement réduite lors de son extraction par les solvants organiques. Pour Kenny, l'antigène lipidique est plus efficace et spécifique que l'antigène chauffé ou extrait par l'éther et ce d'autant plus qu'il semble "hapténisé" lors de son extraction par le chloro-méthanol. Cet antigène est conservé dans l'albumine bovine ce qui augmente sa solubilité.

Actuellement différents types d'antigènes peuvent être utilisés (3) :

- antigènes glycolipidiques membranaires,
- antigènes complets,
- antigènes bruts concentrés.

La réaction effectuée selon une adaptation de la technique de Kolmer, est le plus souvent pratiquée en plaque de microtitration à cupule en U. Elle nécessite différentes étapes : titrage du complément, titrage de l'antigène, titrage de l'anticorps (86).

La RFC détecte essentiellement certaines sous-classes d'IgG et à un degré moindre des IgM. Présents dès le 7ème jour suivant l'infection, les anticorps augmentent rapidement pour se stabiliser après quelques semaines à un taux qui persistera plusieurs mois, voire années (3, 69).

La RFC est actuellement la technique sérologique la plus employée. Simple et rapide (quelques heures à +4°C), sa sensibilité et sa spécificité sont très discutées suivant les auteurs :

- supérieures à 80 % pour certains, inférieures à 50 % pour d'autres (22),
- moins sensible que l'IFI et l'inhibition métabolique (69),
- réactions croisées, dues à l'antigène glycolipidique (ou antigène commun), avec différents micro-organismes (*Mycoplasma genitalium*, *Legionella pneumophila*...), voire avec les constituants de certains tissus (neurologiques, pancréatiques) ou substances présentes dans la nature (3).

Ces données imposent la plus grande prudence lors de l'interprétation des résultats surtout au cours des atteintes extra-respiratoires.

33- HEMAGGLUTINATION INDIRECTE (HAI)

DOWDLE (33) a utilisé pour détecter les anticorps anti-mycoplasmiques des hématies de mouton. Ces hématies traitées par l'acide tanique, adsorbent les antigènes mycoplasmiques et s'agglutinent en nappe en présence des anticorps spécifiques (figure 15).

Le sérum est préalablement décomplémenté et son titre en anticorps correspond à la dernière dilution donnant une agglutination visible. Cette technique rapide (2 à 3 heures à 35°C) ne nécessite pas d'équipement sophistiqué.

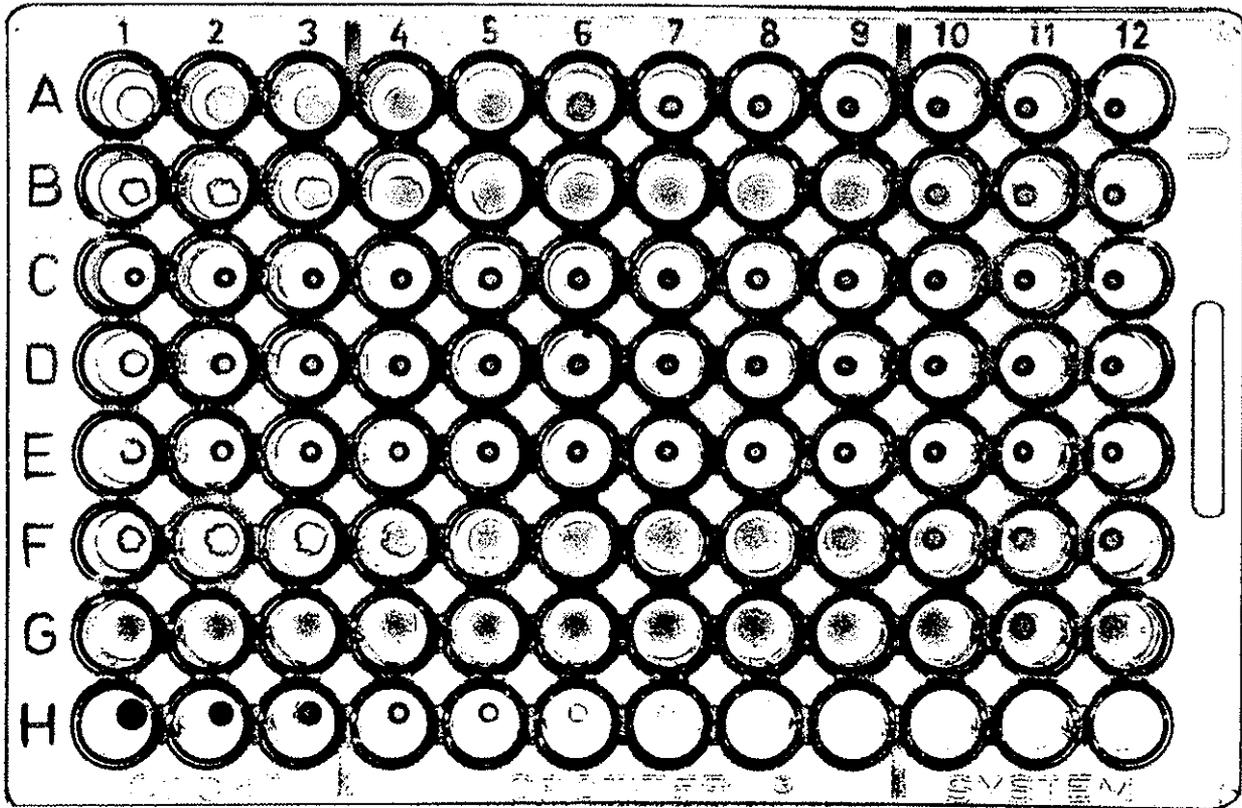


FIGURE 15 : TEST D'HAI

- Positif : en A (au 1/320e), en B (au 1/2560e),
en F (au 1/2560e), en G (au 1/5120e).

- Négatif : en C E D et H.

KOK (69) développe un test d'HAI modifié par rapport à celui de Dowdle :

- les hématies de mouton sont traitées par la glutaraldehyde puis par l'acide tannique,

- des antichaînes μ de lapin sont fixées aux parois des puits dans lesquels le sérum est mis à incuber une nuit avant d'être mis au contact des hématies préalablement traitées.

Cette méthode simple et rapide élimine les faux positifs secondaires à la présence du facteur rhumatoïde. Très sensible et très spécifique, elle présente une bonne corrélation comparée à la culture et n'a pas le désavantage d'être "trop" sensible dans la détection des IgM (qui disparaissent en quelques mois) comparativement à d'autres méthodes diagnostiques.

Sensible et spécifique, l'HAI peut grâce à la méthode décrite ci-dessus détecter différentes classes d'antigènes. Utilisée seule, elle est préférable à la RFC ou à l'IFI. Son seuil de positivité est supérieur ou égal au 160ème. Associée à l'IFI, elle permet un excellent dépistage sérologique (92).

34- REACTIONS D'INHIBITION DE CROISSANCE ET D'INHIBITION METABOLIQUE

341- REACTION D'INHIBITION DE CROISSANCE

En 1963, JENSEN (60) a appliqué au dosage des anticorps anti-mycoplasmiques l'inhibition de croissance de *Mycoplasma pneumoniae* à l'aide d'une souche connue. La culture de *Mycoplasma pneumoniae* est incubée 7 jours à 37°C, associée au sérum à analyser. La présence d'anticorps spécifiques se traduit par l'absence de croissance des colonies. Ces dernières, invisibles à l'oeil nu, sont mises en évidence par l'addition d'hématies de porc dans la culture. La présence de colonies (et donc l'absence d'anticorps) se traduit après une incubation de 48 heures à 37°C par une

hémolyse. L'utilisation quantitative de cette réaction est délicate et sa lecture difficile, aussi lui préfère-t-on les réactions d'inhibition métabolique.

342- REACTIONS D'INHIBITION METABOLIQUE

Ces réactions utilisent deux propriétés métaboliques : la fermentation du glucose et la réduction du tétrazolium.

Réalisées en microméthodes, elles nécessitent l'emploi de plaques stériles avec cupules en U.

L'inhibition de la fermentation du glucose : une culture de *Mycoplasma pneumoniae* fermente le glucose et acidifie le milieu en faisant virer au jaune le rouge de phénol. En présence d'anticorps spécifiques, la réaction ne peut pas se développer et le milieu garde sa couleur rouge d'origine. Le titre du sérum est l'inverse de la plus grande dilution donnant cette inhibition.

L'inhibition de la réduction du tétrazolium : basée sur le même principe, sa lecture est plus délicate (61).

Ces tests sont très sensibles et très spécifiques. Les anticorps inhibant le métabolisme apparaissent plus tardivement que ceux fixant le complément (2ème ou 3ème semaine de l'infection) mais persistent plus longtemps (figure 16).

La lecture de ces réactions peut être faussée par la présence d'antibiotiques dans le sérum du patient, inhibant de façon non spécifique le développement des colonies.

Ces réactions d'inhibition métabolique plus longues et plus délicates à réaliser que la RFC ne sont pas adaptées aux grandes séries ; toutefois, elles n'en gardent pas moins un grand intérêt en raison de leur haute spécificité.

Taux d'anticorps

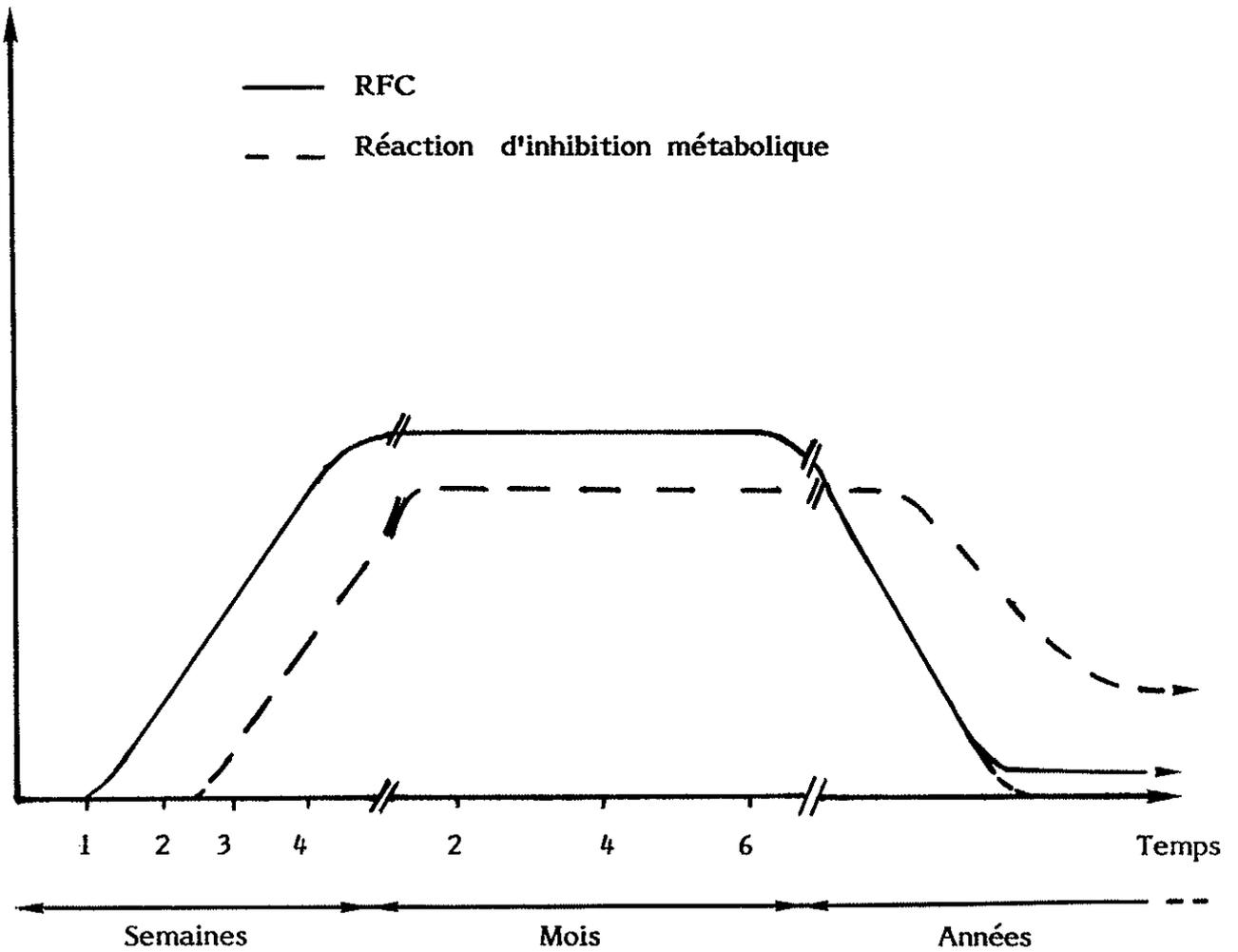


FIGURE 16 : COURBE COMPARATIVE DE L'EVOLUTION DES ANTICORPS
DETECTES PAR RFC ET REACTION D'INHIBITION METABOLIQUE

35- DOSAGE ELISA

Cette méthode a révolutionné depuis quelques années la sérologie de nombreuses infections bactériennes, virales ou parasitaires.

Toutefois, la qualité de l'antigène utilisé reste primordiale. Actuellement, différents types d'antigènes sont exploités :

- les antigènes bruts, peu satisfaisants (6),
- les antigènes entiers (lysés) présentant, du fait des glycolipides, les mêmes problèmes de réactions croisées que ceux rencontrés avec les antigènes utilisés dans la réaction de fixation du complément (14, 22),
- les extraits solubles d'antigènes sonifiés (69, 98),
- les protéines de haut poids moléculaire, dont la protéine P1, contenues dans la membrane mycoplasmique ; elles sont obtenues après séparation électrophorétique sur gel puis élution. Ces protéines sont pures (absence de glycolipides) et spécifiques comme le confirment les techniques d'immunoblotting et immunoenzymatique par compétition avec d'autres mycoplasmes(85).

Suivant l'antigène utilisé, cette méthode peut être très sensible et spécifique, détectant les différentes classes d'immunoglobulines (22). De plus, c'est une technique rapide, automatisable et insensible à la présence d'antibiotiques dans le sérum (14).

Différents tests sont développés et sur le point d'être commercialisés :

DOT-ELISA (57) : la protéine P1 ou protéine d'adhésion enrichie après électrophorèse puis élution, est déposée à la surface d'un bouton de nitrocellulose au fond des puits (en effet, P1 ne peut se fixer correctement à la paroi). Ce test est plus sensible et détecte plus précocément les anticorps que ceux utilisant des antigènes entiers. Aucune réaction croisée n'a été signalée.

MYCOPLASMELISA IgM : LEE (73) considère que la sensibilité de ce test, dont l'antigène n'est pas bien défini, est moins performante que celle de l'IFI lors de la détection des IgM.

PLATELIA-MYCOPLASMA IgG (31) : ULDUM (108) a testé ce kit dont la nature de l'antigène est, là aussi, inconnue et il conclut, après analyse, que l'utilisation de ce test diagnostique n'est pas souhaitable. En effet, chez plus de 80 % des sujets sains ou des patients exempts d'affection mycoplasmaïque, ce test est positif alors que le test de RFC est négatif, et seules les IgG sont détectées, ne permettant pas de préciser le stade de l'infection.

ELISA-IMMUNOCAPTURE IgM (38) : ce test très sensible et très spécifique voit son intérêt décroître avec l'âge du patient. En effet, il ne peut détecter les infections ou réinfections ne présentant pas d'IgM.

Ces tests sur le point d'être commercialisés sont dans l'ensemble décevants. Il faut souligner la perspective à court terme d'une nouvelle génération de tests fiables et performants utilisant des antigènes purs et hautement spécifiques "trop" sensibles (détection prolongée des IgM)(6, 14). Ces tests permettent d'éliminer le bruit de fond dû au grand nombre d'épitopes présents existant dans les tests classiques et les réactions non spécifiques dues aux communautés antigéniques, tout en conservant une grande sensibilité et une grande spécificité.

36- TEST D'INHIBITION DE L'ADHESION DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE A DES GLOBULES ROUGES DE MOUTON EN PRESENCE D'ANTICORPS SPECIFIQUES

C'est à l'heure actuelle le seul test dirigé contre un facteur de virulence de *Mycoplasma pneumoniae* : adhérence aux cellules cibles par l'intermédiaire d'une protéine d'adhésion spécifique et très antigénique (6, 56).

Le sérum décomplémenté est incubé en présence de *Mycoplasma pneumoniae* fixé aux parois des puits des plaques de microtitration. Les anticorps spécifiques présents se fixent aux antigènes, inhibant l'adhésion aux mycoplasmes des hématies de mouton ajoutées dans un deuxième temps. Après lavage, le degré d'adhésion des hématies aux mycoplasmes est défini par la mesure de l'absorbance du milieu, après lyse avec de l'eau distillée des hématies fixées. Le titre en anticorps correspond à la plus grande dilution donnant moins de 50 % d'adhérence (56).

Ce test est rapide (moins de 3 heures), facile à réaliser et reproductible. Très spécifique (absence de réactions croisées) et sensible, il détecterait préférentiellement les IgM. Il se négative au cours de la convalescence (56). Malheureusement, la nécessité d'utiliser des mycoplasmes viables en limite l'emploi (6).

37- AGGLUTINATION DE PARTICULES SENSIBILISEES

Le test décrit par PAPIEROK (86) utilise un antigène membranaire, comprenant des protéines d'adhésion, préparé par centrifugation différentielle à partir d'une culture en milieu liquide.

Après vérification en immunoblotting de la présence des "adhésines" avec des sérums de patients présentant une infection à *Mycoplasma pneumoniae*, l'antigène est fixé par covalence à des billes de latex.

La limite de positivité est de 1/10ème mais il est conseillé en cas d'agglutination fine d'effectuer un nouveau test sérologique une à deux semaines plus tard. Dans le cas d'une séroconversion ou d'un titre élevé en anticorps, l'infection est considérée comme récente. Le titre en anticorps correspond à la plus forte dilution donnant encore une agglutination, même faible. Le test effectué après traitement du sérum au 2 mercapto-éthanol permet de différencier IgM et IgG.

Le test Serodia-MYCO II (4) détecte exclusivement les IgM. Bon test de dépistage, sa sensibilité est insuffisante pour qu'il soit utilisé seul comme test diagnostique de certitude. Il est de meilleure qualité que la RFC surtout lorsqu'il est réalisé chez les sujets jeunes où les IgM spécifiques sont plus fréquemment retrouvées.

Ces tests simples et rapides, sont adaptables à tous les laboratoires. Intéressant comme test de dépistage, il manque toutefois de sensibilité et de spécificité pour être utilisé seul comme test diagnostique.

38- CONTRE IMMUNOELECTROPHORESE

Peu développée en routine, son efficacité est comparable à celle de la RFC (53).

39- IMMUNOBLOTTING

Après fixation sur les antigènes mycoplasmiques correspondants, le nombre et la spécificité des anticorps anti-*Mycoplasma pneumoniae* sont révélés grâce à des antiglobulines marquées, les anticorps spécifiques apparaissent sous la forme d'une bande colorée correspondant à l'antigène reconnu (20, 63). Les antigènes mycoplasmiques ont auparavant été séparés en fonction de leur poids moléculaire

(électrophorèse).

Les anticorps sont repérés en utilisant des antiglobulines marquées par un signal "froid" le plus souvent coloré (phosphatase alcaline, peroxydase). Suivant le test, ces antiglobulines peuvent être : polyclonales ou monoclonales, anti-IgG et/ou anti-IgM.

De nombreuses spécificités antigéniques sont mises en évidence. Toutefois celle correspondant à la protéine d'adhésion reste la plus recherchée (20).

L'utilisation d'antiglobulines spécifiques marquées permet d'étudier les différentes classes d'immunoglobulines présentes dans le sérum (63).

Cette technique est très spécifique et très sensible surtout lorsqu'elle utilise comme antigène la protéine P1 (figure 17). Rapide, elle ne nécessite pas, contrairement à la technique en dot-blot, la purification préalable de l'antigène (déposé sous forme d'un "spot" sur un support solide)(20, 85).

Simple, elle se pratique en l'absence de matériel sophistiqué (20). Les antigènes séparés et fixés sur leur support solide, peuvent se conserver pendant quatre semaines (20).

Un test positif en IgM doit faire éliminer la présence du facteur rhumatoïde par agglutination latex. Toutefois, ce dernier ne semble pas interférer avec la réaction (20).

Des réactions croisées avec *Mycoplasma genitalium* sont possibles mais les deux organismes sont en général différenciés par l'immunoblot (20, 63).

Bien que rarement utilisée en routine, cette technique spécifique et sensible permet d'évaluer les qualités d'un test avec une grande fiabilité.

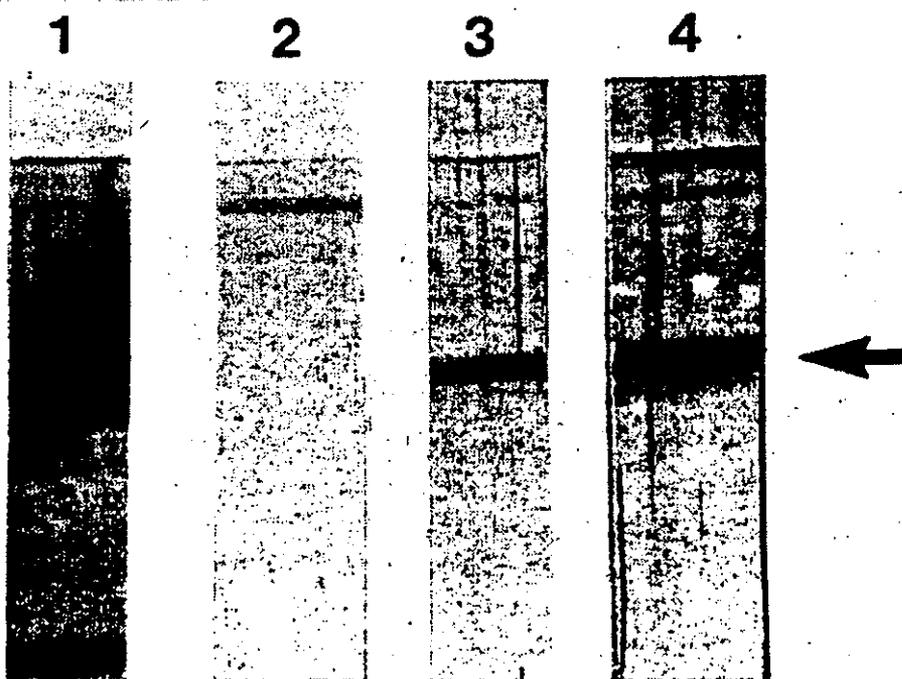


FIGURE 17 : DETECTION PAR IMMUNOBLOTTING DES IGM
DIRIGÉES CONTRE LA PROTEINE P1.

Lignes 1 et 2 : Contrôle + et -,

Ligne 3 : infection aiguë,

Ligne 4 : convalescence.

310- DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE (RIA)

Le sérum est incubé en présence du micro-organisme cultivé dans les puits des plaques de microtitration. Secondairement, les anticorps sériques sont révélés par des antiglobulines marquées à l'I¹²⁵. La radio-activité du complexe est déterminée par un compteur révélant le nombre de coups par minute émis par chaque dosage ou puits (52).

Très spécifique et très sensible, cette technique présente aussi d'autres avantages :

- reproductibilité,
- différenciation des diverses classes d'immunoglobulines,
- faible coût de revient et simplicité : utilisation d'organismes entiers (52),
- absence de relargage de marqueurs radio-actifs dans le milieu contrairement à la radioimmuno-précipitation (52).

PRICE (90) a développé un test capable de mettre en évidence les IgM-anti-mycoplasmiques : des anticorps anti-chaîne lourde μ recouvrent la paroi des puits et fixent sélectivement les IgM présentes dans le sérum du patient. L'introduction dans le milieu réactionnel de *Mycoplasma pneumoniae* marqué au tritium (H^3) permet de révéler la présence d'IgM spécifiques anti-*Mycoplasma pneumoniae*. En effet, les *Mycoplasma pneumoniae* H^3 se fixent sélectivement aux IgM spécifiques, elles-mêmes liées aux anti- μ fixés à la paroi du puits.

Cette technique est la plus sensible et la plus spécifique parmi les méthodes de diagnostic indirect disponibles. Malheureusement, elle ne peut pas être utilisée en routine en dehors des laboratoires agréés du fait de la manipulation de substances radio-actives.

IV - DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Le problème du diagnostic différentiel se pose essentiellement dans deux cas.

41- PNEUMOPATHIES ATYPIQUES PRIMITIVES

Les agents pathogènes responsables sont nombreux :

- *Legionella pneumophila*,
- *Chlamydia pneumoniae* (Twar) et *psittaci*,
- *Coxiella burnetti* (Fièvre Q),
- virus.

Le diagnostic différentiel repose sur plusieurs critères :

- épidémiologique : notion d'épidémie, de contact infectant, facteurs favorisants (alcool, tabagisme, âge, immunodépression, profession, loisir),
- clinique : surtout les signes extra-pulmonaires associés,
- biologiques :
 - . non spécifiques : fonctions rénale, hépatique et pancréatique, étude du LCR,
 - . spécifiques adaptés au(x) germe(s) suspecté(s) :
 - * cultures cellulaires ou/et acellulaires,
 - * sérologies,
 - * autres.

42- MYCOPLASMES AUTRES QUE MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Seul *Mycoplasma pneumoniae* possède un pouvoir pathogène respiratoire certain.

Le pouvoir pathogène de *Mycoplasma hominis* et *Mycoplasma genitalium* (retrouvés au niveau du tractus respiratoire) reste à démontrer, mais semble peu plausible en ce qui concerne le tractus respiratoire. Toutefois des études complémentaires doivent être poursuivies avant de conclure à la non pathogénicité de ces autres mycoplasmes chez les immunodéprimés.

Les techniques diagnostiques utilisant des antigènes spécifiques (ELISA, Immunoblot...) ou mettant en évidence des constituants caractéristiques du micro-organisme (sonde moléculaire, dot-blot, immuno-blot...) permettent de différencier *Mycoplasma pneumoniae* des autres espèces de mycoplasmes. Seul *Mycoplasma genitalium*, qui possède des épitopes ou des structures proches de *Mycoplasma pneumoniae*, peut interférer dans le diagnostic mais, comme nous l'avons vu précédemment, son rôle pathogène reste à prouver.

TROISIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE PROSPECTIVE

Dans ce travail nous nous proposons d'étudier :

- le diagnostic biologique d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*, actuellement utilisé au CHU de Limoges,
- l'amélioration de ce diagnostic pouvant être apportée par l'utilisation d'un nouveau milieu de culture,
- les difficultés techniques rencontrées pour mettre en oeuvre et interpréter les tests de diagnostic.

I- MATERIEL ET METHODES

11- PATIENTS

25 patients présentant des affections broncho-pulmonaires ont été inclus dans cette étude. Ils ont été recrutés au cours des quatre premiers mois de 1991 dans les services de Médecine Interne A, Pathologie Respiratoire, Pédiatrie I et II, Réanimation adulte polyvalente et dans les unités de soins intensifs de Chirurgie B, Chirurgie Thoraco-Vasculaire et Cardiologie.

L'âge moyen de ces patients était de 34,4 ans avec pour extrêmes 3 et 85 ans.

72 % (18/25) des patients étaient de sexe masculin, 28 % (7/25) de sexe féminin.

Deux groupes de patients ont été constitués :

Groupe 1 : suspicion de pneumopathie atypique ou de pneumopathie communautaire apparaissant le plus souvent chez des sujets en bon état général. Ces patients apparaîtront en caractère gras dans les tableaux récapitulatifs.

Groupe 2 : surinfection broncho-pulmonaire ou syndrome infectieux inexplicable survenant chez des sujets intubés, ventilés et/ou immunodéprimés, admis en unité de soins intensifs (traumatismes, comas, infections sévères, greffes hépatiques, pontages coronariens).

Nous nous proposons de décrire les deux observations les plus caractéristiques d'une infection broncho-pulmonaire à *Mycoplasma pneumoniae* et de présenter les autres dans le tableau XIV.

Observation n°1

R. Laetitia, 3 ans, présente le 14 Janvier 1991 une diarrhée peu abondante, des vomissements puis une toux grasse.

Le 18 Janvier 1991, elle est hospitalisée dans le service de Pédiatrie II pour syndrome fébrile et altération de l'état général.

L'examen clinique retrouve une fièvre (39°1 C), une toux grasse avec dyspnée, des ronchi bilatéraux et des crépitants des deux bases.

Sa soeur, 9 mois, a présenté de façon moins marquée les mêmes symptômes, 7 à 8 jours avant.

Le bilan para-clinique est le suivant :

- NFS : globules blancs : 21 600/mm³ (87 % polynucléaires),
hémoglobine : 12g/100 ml,
plaquettes : 347 000/mm³,
- hémocultures, antigènes solubles : négatifs,
- CRP : 26 mg/l,
- radiographie du thorax : pneumopathie diffuse atypique.

Le diagnostic posé est celui d'une pneumopathie atypique primitive.

L'évolution sous josamycine est rapidement favorable (apyrexie en 24 heures) malgré la persistance de la toux et des anomalies radiologiques.

Observation n°2

L. Joël, 7 ans, est hospitalisé le 12 mars 1991 dans le service de Pédiatrie I pour des douleurs abdominales et une hyperthermie apparues les jours précédents.

L'examen clinique retrouve une fébricule (38°C), des douleurs abdominales, et une toux grasse non productive. Le reste de l'examen est normal. Aucune notion de cas contact n'est retrouvée.

Le bilan para-clinique est le suivant :

- NFS : globules blancs : 8 500/mm³ (85 % de polynucléaires),
hémoglobine : 12,59 g/100 ml,
plaquettes : 298 000/mm³,
- CRP : 113 mg/l,
- radiographie du thorax : foyer basal droit mal systématisé et infiltrat

basal gauche.

Le diagnostic posé est celui d'une pneumopathie atypique primitive.

L'évolution immédiate sous josamycine est favorable (apyrexie en 48 heures). Au 8ème jour apparaît une éruption urticarienne spontanément régressive conduisant à l'arrêt du traitement. L'enfant est revu en consultation au 15ème jour. L'état général est satisfaisant, mais la toux et les anomalies radiologiques persistent. Le traitement par josamycine est réintroduit sans entrainer de nouvelle éruption cutanée : l'éruption urticarienne apparue au 8ème jour du traitement est vraisemblablement d'origine mycoplasmique.

Observations n°	3	4	5
Age	82 ans	4 ans	5 ans
Sexe	F	F	M
Date et motif de l'hospitalisation	11 - 01 - 91 Suspicion de connectivite	23 - 01 - 91 Bronchiolite	23 - 01 - 91 Fièvre persistante
Clinique			
Température	38°4C	38°8C	38°-38°5C
Etat général	Conservé	Conservé	Conservé
Manifestations pulmonaires	Toux Examen clinique normal	Dyspnée superficielle Tirage intercostal Ronchi bilatéraux	Absence
Manifestations extra-pulmonaires	Céphalées Conjonctivite Rhinorrhée Rhumatisme déformant	Gorge érythémateuse	Angine Otite gauche (G) Douleurs musculaires et articulaires
Epidémiologie			
Facteurs favorisants	Néant	Néant	Néant
Biologie			
NFS			
- globules blancs/mm ³	117 000	5 000	20 000
- hémoglobine g/100ml	N	N	10,8
- plaquettes/mm ³	N	N	1 180 000
VS mm 1ère/2ème H	70/80	N.R	90/104
CRP mg/l	72,5	50,4	79
TGO/TGP UI/ml	28/14	N.R	N.R
Cliché thoracique	Syndrome bronchique	Atélectasie segmentaire et opacités diffuses	Syndrome interstitiel bilatéral Syndrome bronchique droit (D)
Diagnostic clinique	Pneumopathie atypique Connectivite ?	Pneumopathie à pneumocoque ?	Maladie de Still
Traitement	Désinfection rhinopharyngée Josamycine	Phénoxyméthylpenicilline Antipyrétiques	Anti-inflammatoires Phénoxyméthylpenicilline
Evolution	Amélioration	Amélioration	Amélioration du syndrome inflammatoire

TABLEAU XIV : OBSERVATIONS DES PATIENTS PRESENTANT UNE INFECTION BRONCHO-PULMONAIRE

Observations n°	6	7	8
Age	18 ans	48 ans	85 ans
Sexe	M	M	F
Date et motif de l'hospitalisation	18 - 01 - 91 Myocardite aigüe	19 - 01 - 91 Greffe cardiaque	24 - 01 - 91 Syndrome confusionnel fébrile
Clinique			
Température	38°C	38°5C évoluant par poussées	38°-39°C
Etat général	Altéré	Conservé	Altéré
Manifestations pulmonaires	Dyspnée Toux grasse productive Frottement pleural D	Toux sèche Foyers crépitants base gauche	Toux sèche Hypoventilation basale gauche et crépitants
Manifestations extra-pulmonaires	Collapsus cardio-vasculaire Obnubilation Céphalées Troubles digestifs	Eruption vésiculo-pustuleuse pied D Adénopathie douloureuse loco-régionale	Désorientation temporo-spatiale
Epidémiologie			
Facteurs favorisants	Episode pseudo-grippal	Immunodéprimé S I de CTV	Episode pseudo-grippal
Biologie			
NFS			
- globules blancs/mm ³	13 600	5 000	14 400 dont 70 PN
- hémoglobine g/100ml	9	8,5	13
- plaquettes/mm ³	N	219 000	N
VS mm 1ère/2ème H	4 ?	N	15/30
CRP mg/l	N.R	N.R	N.R
TGO/TGP UI/ml	Sup 200-300	37/38	35/37
Cliché thoracique	Opacité basale D Epanchement pleural bilatéral	Atélectasie base G Foyers disséminés	Foyer basal G Epanchement pleural G
Diagnostic clinique	Myocardite aigüe virale ?	Surinfection virale (CMV) et bactérienne	Infection pulmonaire Anémie hémolytique
Traitement	Corticoïdes Polyantibiothérapie	Antiviraux Polyantibiothérapie	Roxythromycine
Evolution	Décès d'origine indéterminée	Amélioration	Amélioration

TABLEAU XIV : (Suite n°1)

Observations n°	9	10	11
Age	41 ans	7 ans	71 ans
Sexe	M	M	M
Date et motif de l'hospitalisation	29 - 01 - 91 Absès rénal Septicémie	13 - 02 - 91 Hyperthermie, toux, douleurs thoraciques	17 - 01 - 91 Troubles neurologi- ques fébriles
Clinique Température	40°C	39°-40°C	39°C
Etat général	Altéré	Altéré	Altéré
Manifestations pulmonaires	Toux non productive Dyspnée d'effort puis détresse respiratoire	Toux productive Douleurs thoraciques Matité basale D.	Absentes Sujet intubé, ventilé
Manifestations extra-pulmonaires	Douleurs lombaires en barre Encéphalopathie	Discrète raideur ménagée Vomissements	Asthénie, myalgies, arthralgies, troubles de l'équilibre, obnu- bilation, ictère cutanéomuqueux
Epidémiologie Facteurs favorisants	Intoxication éthylique	N.R	Absence
Biologie NFS - globules blancs/mm ³ - hémoglobine G/100ml - plaquettes /mm ³ VS mm 1ère/2ème H CRP mg/l TGO/TGP UI/ml	29 000 9 296 000 78/90 N.R 31/30	11 300 dont 93 PN 10,8 N 94/110 271 N.R	9 000 10,5 180 000 N.R N.R 38/330
Cliché thoracique	Foyer pulmonaire basal D	Foyer basal du lobe inférieur D	Foyer basal D
Diagnostic clinique	Septicémie bac- térienne Encéphalopathie	Pneumopathie	Choc septique Méningite à Listeria
Traitement	Antiviraux Polyantibiothérapie	Amoxicilline, acide clavulanique, pheno- xyméthyl-penicilline	Ampicilline, amika- cine Hémodialyse
Evolution	Amélioration	Amélioration en 24 H	IRA Altération fonctions cardiaques. Décès

TABLEAU XIV : (Suite n°2)

Observations n°	12	13	14
Age	22 ans	42 ans	58 ans
Sexe	M	F	M
Date et motif de l'hospitalisation	CS externe le 16 - 02 - 91 Dyspnée et toux	11 - 02 - 91 Greffe hépatique	20 - 02 - 91 Pneumopathie hypo- xémiante
Clinique Température	37°C	37°C	38°C
Etat général	Conservé	Conservé	Altéré
Manifestations pulmonaires	Toux non productive Sibilants et râles fins bilatéraux	Absence	Crachats purulents Cyanose Encombrement bronchique
Manifestations extra-pulmonaires	Absence	Absence	Obnubilation Absence de déficit neurologique(muscul. tendineux)
Epidémiologie Facteurs favorisants	Pneumopathie persistante (famil.)	Immunodéprimé SI de Chirurgie B	N.R
Biologie NFS - globules blancs/mm ³ - hémoglobine g/100 ml - plaquettes /mm ³ VS mm 1ère/2ème H CRP mg/l TGO/TGP UI/ml	68 000 16 27 000 4/6 N.R N	11 000 10,9 N N.R N.R 35/167	6 700 12 177 000 N.R N.R N
Cliché thoracique	Infiltrat intersti- tiel bilatéral	Atélectasie basale D Epanchement pleural D	Pneumopathie bila- térale des bases
Diagnostic clinique	Pneumopathie atypique	Epanchement pleural post-opératoire	Pneumopathie bila- rale asphyxiante bactérienne
Traitement	Josamycine	Absence	Polyantibiothérapie Aspiration bronchique
Evolution	Amélioration	Amélioration	Amélioration

TABLEAU XIV : (Suite n°3)

Observations n°	15	16	17
Age	5 ans	55 ans	52 ans
Sexe	M	M	F
Date et motif de l'hospitalisation	23 - 02 - 91 Syndrome abdominal fébrile	24 - 02 - 91 Coma stade II	16 - 03 - 91 Douleur thoracique fébrile
Clinique			
Température	38-39°C	33°C	39°C
Etat général	Conservé	Altéré	Conservé
Manifestations pulmonaires	Toux grasse Auscultation normale	Encombrement	Dyspnée Matité base G avec dim. murmure vésiculaire et des vibrations vocales
Manifestations extra-pulmonaires	Vomissements Abdomen sensible	Coma stade II	Asthénie Nausées
Epidémiologie Facteurs favorisants	N.R	Silico-tuberculose	N.R
Biologie			
NFS			
- globules blancs /mm ³	20 000 dont 80 %PN	13 000	11 000
- hémoglobine g/100ml	11,2	11	12,5
- plaquettes/mm ³	331 000	579 000	N
VS mm 1ère/2ème H	96/100	N.R	N.R
CRP mg/l	414	N.R	N.R
TGO/TGP UI/ml	N	65/78	N
Cliché thoracique	Foyers base D et sommet G	Pneumopathie G Début abcédation	Atélectasie Epanchement pleural
Diagnostic clinique	Pneumopathie bilatérale : germe ?	Décompensation d'une IRC origine infectieuse ?	Epanchement pleural inflammatoire récidivant : origine ?
Traitement	Amoxicilline, acide clavulanique, josamycine, amikacine	Polyantibiothérapie	Polyantibiothérapie
Evolution	Amélioration	Amélioration	Pleurésies itératives

TABLEAU XIV : (Suite n°4)

Observations n°	18	19	20
Age	4 ans	36 ans	31 ans
Sexe	M	M	M
Date et motif de l'hospitalisation	18 - 03 - 91 ORL	18 - 03 - 91 Violente douleur thoracique D	13 - 03 - 91 Traumatisme crânien
Clinique Température	40°C	40°C	?
Etat général	Conservé	Conservé	Coma
Manifestations pulmonaires	Douleurs thoraciques Toux productive non purulente Râles sous-crêpitants	Dim. peu marquée du murmure vésiculaire Douleur thoracique intense	
Manifestations extra-pulmonaires	Douleurs abdominales Vomissements	Céphalées, frissons, sueurs	Coma stade II : intubé, ventilé Brèche ostéo-méningée Discrète monoplégie
Epidémiologie Facteurs favorisants	N.R	N.R	Réanimation
Biologie NFS - globules blancs/mm ³ - hémoglobine g/100ml - plaquettes /mm ³ VS 1ère/2ème H CRP mg/l TGO/TGP UI/ml	18 000 9,4 857 000 55/80 150 N	13 200 14,8 258 000 45/52 N.R N	15 800 11,9 550 000 N.R N.R 183/467
Cliché thoracique	Foyers lobe moyen D	Condensation parenchymateuse du lobe supérieur D	Sub N
Diagnostic clinique	Pneumopathie aigüe	Suspicion PFLA	Syndrome infectieux Pneumopathie nosocomiale
Traitement	Josamycine Anti-inflammatoires	Polyantibiothérapie	Polyantibiothérapie
Evolution	Amélioration	Amélioration	Amélioration

TABLEAU XIV : (Suite n°5)

Observations n°	21	22	23
Age	5 ans	38 ans	19 ans
Sexe	F	M	M
Date et motif de l'hospitalisation	19 - 03 - 91 Syndrome bronchique	25 - 03 - 91 Choc septique	27 - 03 - 91 Traumatisme crânien
Clinique			
Température	37°C	40°C	38°C
Etat général	Conservé	Altéré	Conservé
Manifestations pulmonaires	Toux invalidante, sèche quinteuse Sibilants diffus	Toux, expectoration purulente Détrousse respiratoire Intubé, ventilé	Trachéotomisé
Manifestations extra-pulmonaires	Amygdales volumi- neuses cryptiques	Hémodynamique précaire	Paraplégique
Epidémiologie Facteurs favorisants	N.R	Réanimation	Réanimation
Biologie			
NFS			
- globules blancs/mm ³	12 600	7 600	15 500
- hémoglobine g/100ml	11,5	8, 5	13,1
- plaquettes/mm ³	515 000	450 000	328 000
VS mm 1ère/2ème H	N.R	N.R	N.R
CRP mg/l	11,8	N.R	N.R
TGO/TGP UI/ml	N.R	72/135	151/330
Cliché thoracique	Pneumopathie hili- fuge bilatérale	Foyer systématisé D puis G	Foyers systématisés
Diagnostic clinique	Pneumopathie atypique	Septicémie Pneumopathie en voie d'abcédation	Pneumopathie noso- comiale ?
Traitement	Josamycine	Polyantibiothérapie	Amoxicilline, acide clavulanique, amika- cine
Evolution	Amélioration	Amélioration	Amélioration

TABLEAU XIV : (Suite n°6)

Observations n°	24	25
Age	73 ans	49 ans
Sexe	M	M
Date et motif de l'hospitalisation	23 - 02 - 91 Pontage coronarien	18 - 03 - 91 Greffe hépatique
Clinique Température	40°C	39-39°5C
Etat général	Altération	Altération
Manifestations pulmonaires	Dyspnée Crépitants des bases (25 - 03 - 91)	Ventilation assistée
Manifestations extra-pulmonaires		
Epidémiologie Facteurs favorisants	SI de CTV	Immunodéprimé SI de Chirurgie B
Biologie NFS - globules blancs/mm ³ - hémoglobine g/100ml - plaquettes/mm ³ VS mm 1ère/2ème H CRP mg/l TGO/TGP UI/ml	25 000 11,3 157 000 N.R N.R N	12 000 6 570 000 N.R N.R 90/119
Cliché thoracique	Pneumopathie basale D	Atélectasie basale D Epanchement pleural
Diagnostic clinique	Pneumopathie nosocomiale	Pneumopathie nosocomiale
Traitement	Polyantibiothérapie	Polyantibiothérapie
Evolution	Amélioration	Rejet greffe Amélioration puis décès (hémorragie digestive)

TABLEAU XIV : (Suite n°7)

12- MATERIEL

121- MILIEU DE CULTURE EXPERIMENTAL TESTE LORS DE CE TRAVAIL (BIO MERIEUX).

Ce milieu utilisé pour la culture et l'isolement de *Mycoplasma pneumoniae* est constitué (figure 18A) :

- d'un bouillon :
 - . bouillon lyophilisé régénéré par un bouillon de reprise,
 - . pH : 7,4,
 - . indicateur coloré (rouge) permettant de suivre l'évolution de ce pH. Un virage au jaune de l'indicateur coloré traduit l'acidification du bouillon,

- d'une gélose transparente contenue dans une boîte de Pétri de 55 mm de diamètre.

Ce milieu est conservé à +4°C.

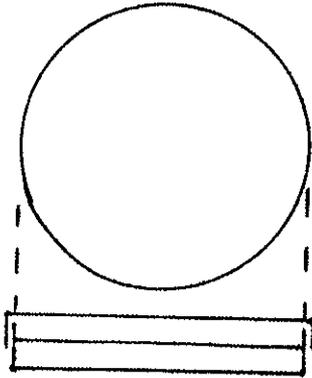
Remarque : la composition de ce milieu de culture ne nous a pas été communiquée.

122- AUTRES MILIEUX DE CULTURE UTILISES

122-1 MYCOPLASMA KIT (BIO MERIEUX)

Ce milieu utilisé pour la culture et l'isolement des mycoplasmes urogénitaux est constitué (figure 18B) :

GELOSE



BOUILLON

Lyophilisé

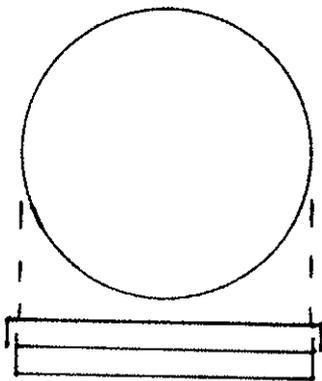


de reprise



A - MILIEU DE CULTURE EXPERIMENTAL

GELOSE



BOUILLON



B - MYCOPLASMA KIT

FIGURE 18 : MILIEUX DE CULTURE

- d'un bouillon contenant :
 - . une base nutritive riche (peptone, extraits de levure...),
 - . de l'urée,
 - . de l'arginine,
 - . du rouge de phénol mettant en évidence la variation de pH (6,1) liée à l'utilisation de l'urée par *Ureaplasma urealyticum* ou de l'arginine par *Mycoplasma hominis*,
- d'une gélose contenant également :
 - . une base nutritive riche,
 - . du sulfate de manganèse (permettant l'identification d'*Ureaplasma urealyticum*),
 - . un pH à 6,4.

Ce milieu est conservé entre +2 et +8°C.

122-2- GELOSE AU SANG (BIO MERIEUX)

Gélose Columbia au sang de cheval conservée à +4°C.

13- METHODES

131- PRELEVEMENTS ET CONDITIONS DE TRANSPORT

Les prélèvements effectués sont les suivants :

- écouvillonnages de gorge,
- expectorations vraies (obtenues avec l'aide d'un kinésithérapeute),
- lavages broncho-alvéolaires (LBA) par du sérum physiologique, recueillis lors d'une fibroscopie bronchique,

- brossages par brosses protégées placées dans 0,5 ml de soluté de Ringer, effectués seuls ou en complément du lavage broncho-alvéolaire.

Ces prélèvements parviennent dans le service de Bactériologie-Virologie sans condition de transport particulière.

Le temps séparant le prélèvement de l'échantillon de son arrivée dans le service n'est pas connu avec précision. Variable, il se situe en général entre 1 et 4 heures.

Au cours de cette étude, nous avons particulièrement insisté sur la nécessité d'un transport rapide du fait de la fragilité du micro-organisme. Les délais ont donc, dans le cadre de la présente étude, été raccourcis.

132- ENSEMENCEMENT ET INCUBATION DES MILIEUX DE CULTURE

La figure 19 résume la stratégie diagnostique que nous avons utilisée.

132-1- MILIEU DE CULTURE EXPERIMENTAL (MCE)

132-11- Ensemencement

Le milieu est rapidementensemencé dans les conditions suivantes :

- pour les prélèvements liquides (lavages broncho-alvéolaires, expectorations, brosses et soluté de Ringer)(figure 20) :

- . homogénéisation du prélèvement non traité (digesteur) à l'aide d'un agitateur,

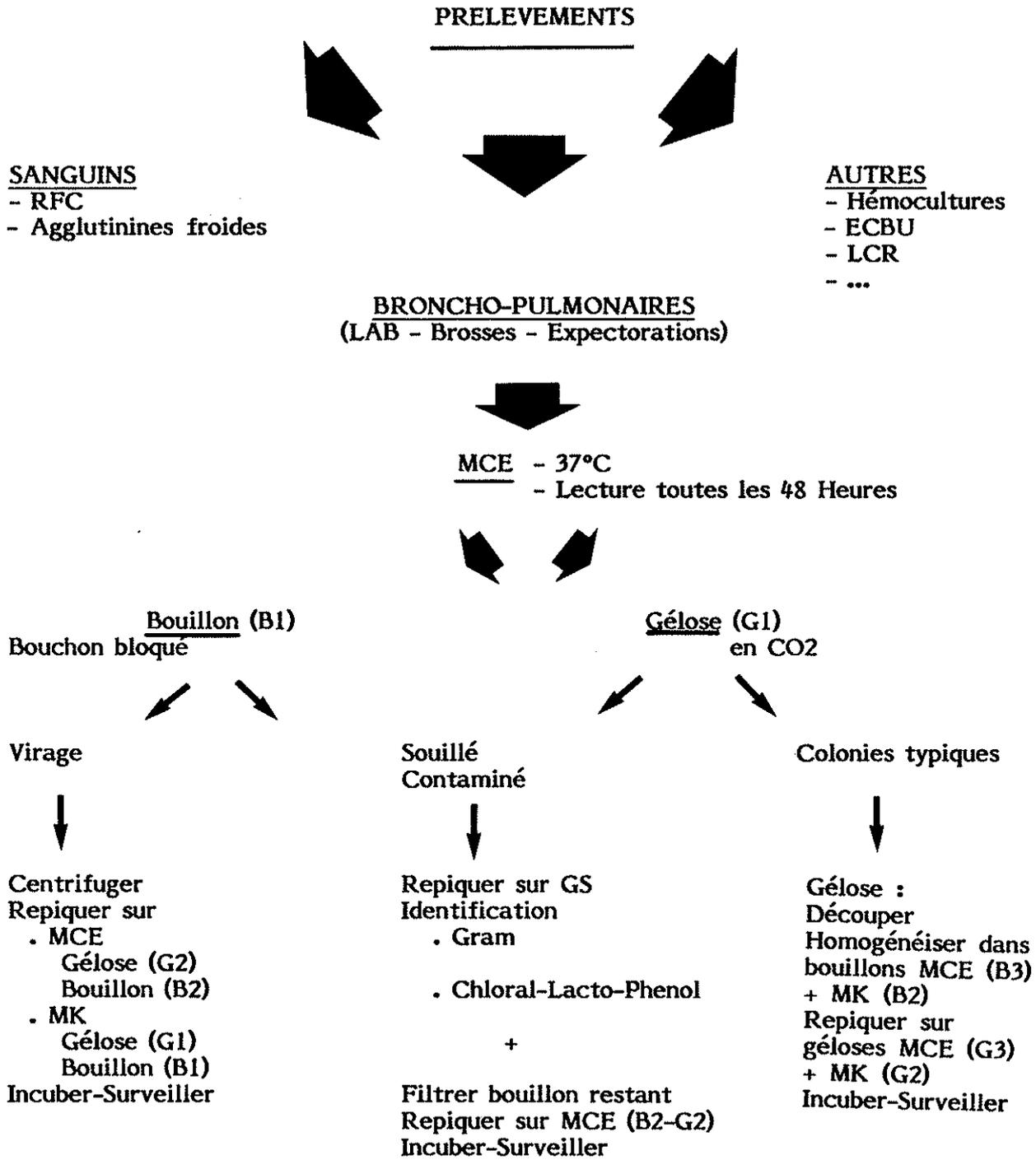
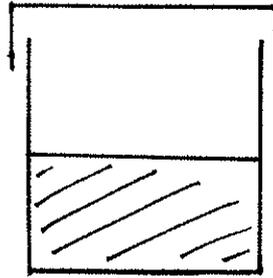
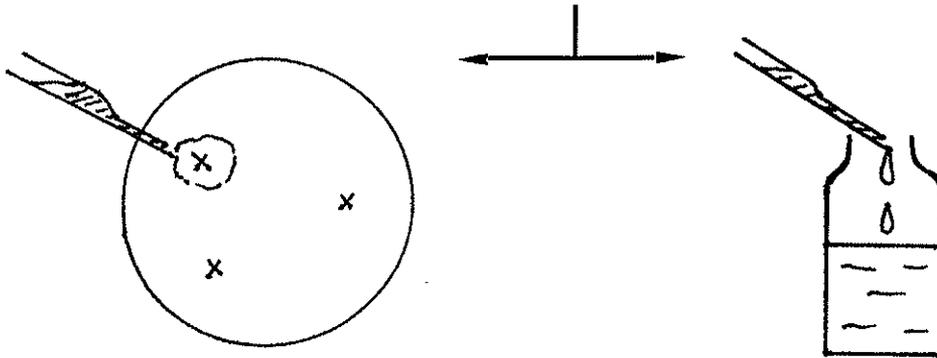


FIGURE 19 : STRATEGIE DIAGNOSTIQUE



1) Prélèvement liquide (Expectoration - LAB - Brosse)

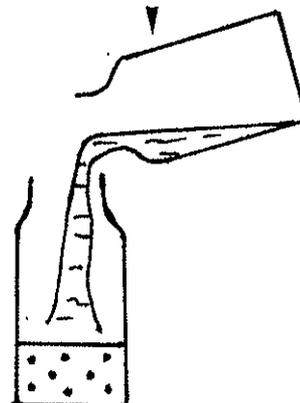


2) Ensemencer la gélose

2) Ensemencer bouillon de reprise



3) Homogénéiser (agitateur)



4) Régénérer avec 2) le bouillon lyophilisé puis homogénéiser (manuel)

FIGURE 20 : ENSEMENCEMENT DU MCE A PARTIR
DES PRELEVEMENTS LIQUIDES

- . dépôt à distance de la paroi d'une goutte en 3 points séparés de la gélose préalablement séchée à l'étuve à 35-37°C pendant 15 minutes,
 - . mise en suspension de 200 µl du prélèvement dans un flacon de bouillon de reprise, homogénéisation à l'aide d'un agitateur puis transfert de la totalité du bouillon de reprise dans le flacon de bouillon lyophilisé et homogénéisation douce manuelle,
- pour les écouvillons (figure 21) :
- . relargage de l'écouvillon du prélèvement dans le bouillon de reprise, puis homogénéisation à l'agitateur,
 - . transfert de la totalité du bouillon de reprise dans le bouillon lyophilisé, homogénéisation manuelle,
 - . reprise du bouillon ainsiensemencé et dépôt à distance de la paroi, par goutte en 3 points séparés de la gélose préalablement séchée.

Dans notre étude, les prélèvements reçus ont été rapidementensemencés. Toutefois, il est possible de conserver ceux-ci dans le bouillon de reprise pendant 4 à 5 heures à température ambiante ou pendant 24 heures à +4°C.

Pour chaqueensemencement étaient notées sur la boîte ou le flacon, la date de l'ensemencement et la provenance du prélèvement (nom du patient, service d'hospitalisation). De plus, pour chaque boîte, lesensemencements ont été localisés sous la forme d'un point.

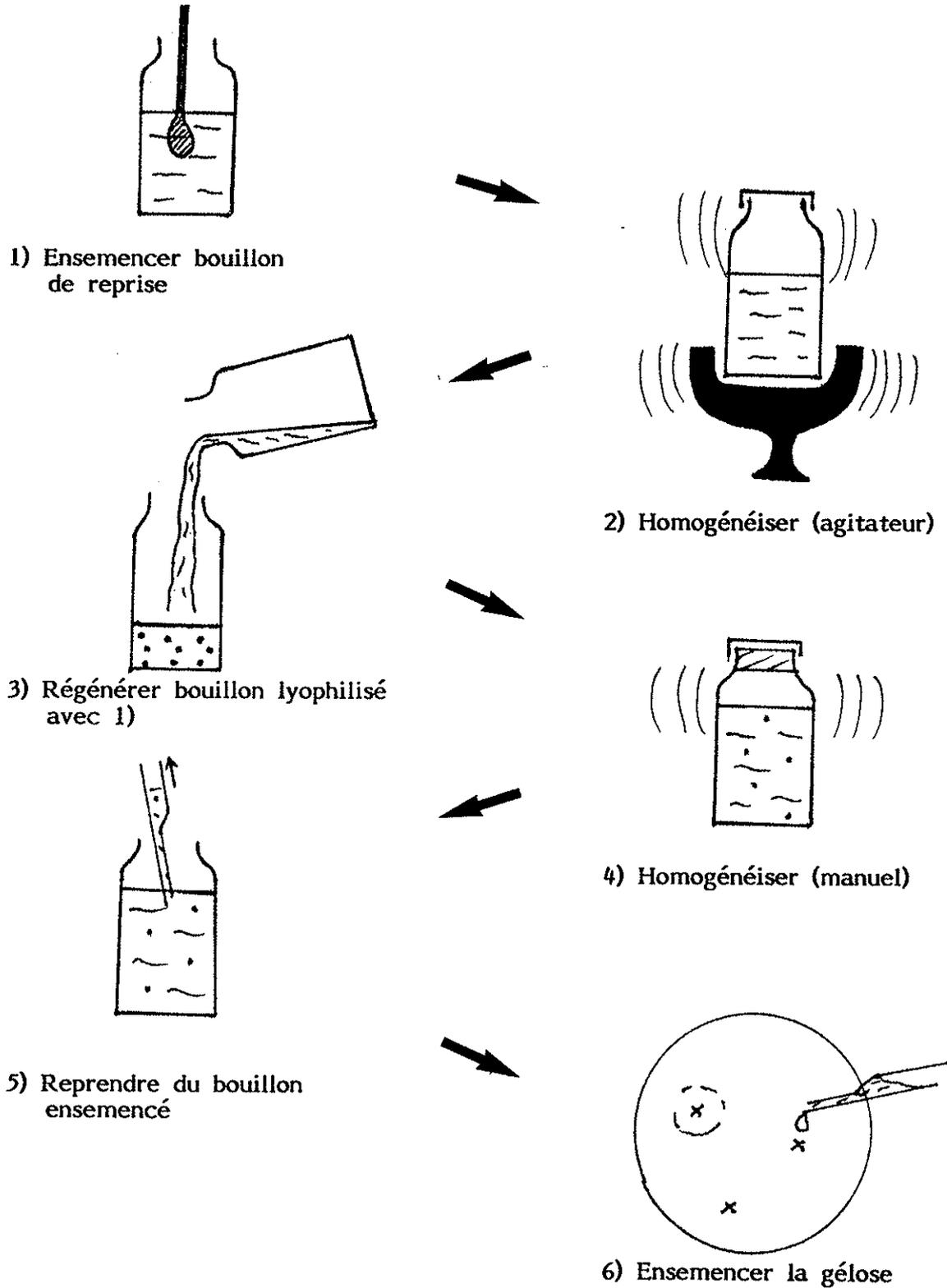


FIGURE 21 : ENSEMENCEMENT DU MCE A
PARTIR D'UN ECOUVILLON

132-12- Incubation

Les bouillons sont incubés à 35-37°C, capsules bloquées.

Les géloses sont incubées à 35-37°C en atmosphère enrichie en CO₂ à 5 %.

132-2- AUTRES MILIEUX

Ces milieux n'ont été utilisés qu'en complément du **MCE**, soit pour éliminer un autre mycoplasme, soit pour éliminer ou identifier un ou plusieurs contaminants.

132-21- Mycoplasma kit (MK)

Ce milieu utilisé pour le diagnostic des mycoplasmes urogénitaux : *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*, est ensemencé à partir du bouillon ou de la gélose du **MCE** en cas de culture positive, afin d'affirmer ou d'éliminer la présence de *Mycoplasma hominis* (*Ureaplasma urealyticum* n'étant pas isolé au niveau du tractus respiratoire).

Bouillon du **MK** :

- ensemencé à partir de la gélose et/ou du bouillon expérimental,
- homogénéisation à l'agitateur,
- incubation à 35-37°C bouchon bloqué,
- un virage au rouge-framboise dû à l'acidification du milieu, traduit la présence de *Mycoplasma hominis*.

Gélose du **MK** :

- ensemencement à partir du bouillon du **MK** homogénéisé. Dépôt d'une goutte du bouillon en 3 points de la gélose préalablement séchée à l'étuve à 35-37°C pendant 15 minutes,

- incubation à 35-37°C en atmosphère enrichie en CO₂,
- la croissance de *Mycoplasma hominis* se traduit le plus souvent par la présence de colonies granuleuses.

132-22- Gélose au sang (GS)

Ensemencement en stries à partir du bouillon homogénéisé du **MCE** et/ou du **MK** et à partir des colonies se développant sur les géloses du **MCE** et/ou du **MK**.

Incubation au moins 48 heures à 37°C.

De même que pour les **MCE**, date de l'ensemencement, provenance du prélèvement et pour les géloses du **MK**, localisation des ensemencements ont été portées sur les supports des milieux de culture.

133 - SURVEILLANCE ET METHODES D'IDENTIFICATION (figure 19)

133-1- LES MILIEUX DE CULTURE SONT OBSERVES TOUTES LES 48 HEURES

Sont recherchés :

- 1) un virage au jaune du bouillon traduisant l'acidification du milieu (hydrolyse du glucose),
- 2) le développement sur la gélose de colonies en "oeuf sur le plat", caractéristiques des mycoplasmes. La gélose est examinée au microscope inversé, la lecture portant essentiellement sur la périphérie des ensemencements,
- 3) une contamination du bouillon et/ou de la gélose

133-2- EN CAS DE CULTURE POSITIVE SUR MILIEU DE
CULTURE EXPERIMENTAL

1) Le bouillon vire au jaune tout en restant limpide ou en présentant un faible dépôt :

- après centrifugation (à 1500 tours/mn pendant 10 minutes), le culot, riche en micro-organismes, est remis en suspension dans une petite quantité de surnageant,

- cette suspension est réensemencée dans :

. un bouillon et une gélose du **MCE**,

. un bouillon et une gélose du **MK**,

- ces milieux sont mis à incuber et surveillés dans les mêmes conditions que précédemment (bouchon bloqué, à 35-37°C pour les bouillons, à 35-37°C en atmosphère enrichie en CO₂ pour les géloses, lecture toutes les 48 heures).

2) Sur la gélose se développent des colonies typiques en "oeuf sur le plat" : ce sont des mycoplasmes :

- la gélose est découpée stérilement puis homogénéisée à l'aide d'un agitateur dans un bouillon du **MCE** et dans un bouillon du **MK**,

- chaque bouillon est repris pour ensemercer les géloses correspondantes,

- ces milieux sont mis à incuber et surveillés dans les mêmes conditions que précédemment (bouchon bloqué, à 35-37°C pour les bouillons, 35-37°C en atmosphère enrichie en CO₂ pour les géloses, lecture toutes les 48 heures). Cette technique de repiquage est préférée à celle du "pushing block" décrite précédemment.

Il est important de noter que *Mycoplasma pneumoniae* peut se développer simultanément ou séparément sur gélose et en bouillon.

133-3- EN CAS DE CONTAMINATION DU MILIEU DE CULTURE EXPERIMENTAL

1) Le bouillon contaminé se trouble et contient le plus souvent un dépôt important :

- pour identifier le ou les contaminants : le bouillon, homogénéisé à l'agitateur, est repris pour ensemer une **GS**. Après une incubation de 48 heures, les colonies présentes seront examinées après coloration de Gram (bactéries-levures) et éclaircissement au chloral-lacto-phénol (champignons-moisissures),

- le bouillon restant est filtré (filtre de 45 µm), repiqué sur un nouveau **MCE** puis mis à incuber dans les mêmes conditions que précédemment.

2) Sur la gélose se développent des colonies visibles à l'oeil nu :

- ces colonies sont repiquées sur une **GS**, mises à incuber 48 heures à 37°C, examinées après coloration de Gram et éclaircissement au chloral-lacto-phénol.

3) Sur la gélose se développent des souillures visibles uniquement au microscope.

- Ces souillures, le plus souvent filamenteuses, apparaissent en fin d'incubation et n'ont pu être identifiées car elles étaient incluses dans la gélose et de très petite taille.

L'identification des contaminants et l'étude de leur sensibilité *in vitro* vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques sont indispensables pour adapter le milieu expérimental et le rendre ainsi plus sélectif.

134- TESTS SEROLOGIQUES

Ces tests sont utilisés parallèlement à l'étude sur milieu de culture.

134-1- REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

Ce test sérologique permet de déterminer la présence et le titre des anticorps anti-*Mycoplasma pneumoniae*.

L'antigène est obtenu à partir de *Mycoplasma pneumoniae* inactivés selon un procédé spécial (Behring).

Cette technique, dérivée de la méthode de Kolmer, est pratiquée en plaques de microtitration dans le service de Parasitologie-Mycologie.

Deux prélèvements sont effectués sur tubes secs à 10-15 jours d'intervalle, afin de mettre en évidence une séroconversion ou une augmentation du titre en anticorps.

134-2- AGGLUTININES FROIDES

La recherche des agglutinines froides et la détermination de leur titre se fait dans le service d'Hématologie Immunologie.

Le prélèvement, sur tube sec, est effectué quand cela est possible, une dizaine de jours après l'apparition de l'infection.

135- AUTRES TESTS PRATIQUES

Pour orienter le diagnostic clinique, d'autres tests biologiques sont pratiqués parallèlement aux tests décrits précédemment. Nombreux, leur choix est adapté au tableau clinique.

135-1- DIAGNOSTIC DIRECT

135-11- Examen direct et culture des prélèvements

Les prélèvements réalisés sont les suivants :

- expectorations, lavages broncho-alvéolaires, brosses,
- sanguins (Hémocultures),
- urinaires (Examen cytbactériologique des urines),
- selles (Coprocultures),
- liquide céphalo-rachidien (examen direct, cultures bactériennes et virales).

135-12- Antigènes solubles

La recherche concerne les antigènes solubles, le plus souvent sériques, de : Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae (groupe B), Haemophilus influenzae b, Neisseria meningitidis A-B-C.

135-2- DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

135-21- Diagnostic sérologique bactérien

Les sérologies bactériennes recherchées sont les suivantes :

- Chlamydia (trachomatis, psittaci), Rickettsia, Legionella,
- Mycobactéries,
- Borrelia,

- Salmonella (typhi, paratyphi).
- Yersinia...

135-22- Diagnostic sérologique viral

Les sérologies virales effectuées sont les suivantes :

- rubéole, rougeole, oreillons,
- VRS, myxo et paramyxovirus, adenovirus,
- grippe,
- CMV, herpès, EBV,
- HIV,
- HAV, HBV.

135-23- Diagnostic sérologique aspergillaire

135-24- Diagnostic sérologique toxoplasmique

II - RESULTATS

Tous les résultats de cette étude sont rapportés sur le tableau XV.

La taille de notre échantillon (25 patients) n'a pas permis une analyse statistique fine. Toutefois, il était intéressant d'analyser nos données cliniques, biologiques et épidémiologiques.

21- RESULTATS CLINIQUES

Deux groupes de patients sont constitués en fonction du tableau clinique et plusieurs paramètres sont analysés (figure 22).

Groupe 1 : suspicion de pneumopathie atypique primitive ou de pneumopathie communautaire.

Il réunit 13 observations (n° : 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 18, 19, 21) :

- la moyenne d'âge est de 24,4 ans et 54 % (7/13) ont moins de 10 ans,
- 46 % (6/13) sont de sexe féminin,
- l'infection survient toujours chez un patient en bonne santé, et l'évolution est satisfaisante avec ou sans traitement anti-infectieux,
- l'étude épidémiologique retrouve dans 31 % (4/13) des cas, des antécédents infectieux récents, personnels ou familiaux (observations n° 1, 5, 8, 12).

Groupe 2 : surinfection le plus souvent broncho-pulmonaire se développant sur un terrain préalablement "fragilisé".

Il réunit 12 observations (observations n° : 6, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 20, 22, 23, 24, 25) :

- la moyenne d'âge est de 45,25 ans et 25 % (3/12) ont moins de 40 ans,

Observations n°	1	2	3
Prélevement Date Type	19 - 01 - 91 Expectoration	14 - 03 - 91 Expectoration	12 - 01 - 91 Expectoration
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	19 - 01 - 91 B1 : + à J12 repiqué sur MK (1)	14 - 03 - 91 B1 : trouble à J4 repiqué sur MCE (2) MK (1) B2 : -	12 - 01 - 91 B1 : -
Gélose (G)	G1 : + à J16	G1 : - G2 : + à J4	G1 : -
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	07 - 02 - 91 B1 : -	26 - 03 - 91 B1 : + à J10	N.R
Gélose (G)	G1 : -	G1 : + à J2	N.R
Ensemencement GS	N.R	+	N.R
Micro-organismes isolés	Mycoplasma pneumonia	Cocci Gram + Mycoplasma hominis Mycoplasma pneumoniae	-

RFC 1ère détermination 2ème détermination	20 - 01 - 91 : - 30 - 01 - 91 : -	N.R 28 - 03 - 91 : + (sup 128e)	17 - 01 - 91 : - 12 - 02 - 91 : + (1/4)
Agglutinines froides	N.R	28 - 03 - 91 : + (1/2)	-

Autres tests Examen direct Culture Antigènes solubles	N.R	ECBC : Streptocoque non hémolytique (10 ⁸ /ml)	N.R
Sérologies	N.R	N.R	Chlamydia : + (1/16) Rickettsie : -

TABEAU XV : RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES

Observations n°	4	5	6
Prélèvement Date Type	24 - 01 - 91 Expectoration	29 - 01 - 91 Ecouvillon	04 - 02 - 91 Expectoration
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	24 - 01 - 91 B1 : -	29 - 01 - 91 B1 : +, Troubles à J5 repiqué sur G/MCE(2)	04 - 02 - 91 B1 : -, trouble à J18
Gélose (G)	G1 : + à J7 repiquée sur G/MCE (3), sur MK (2) G3 : -	G1 : souillée à J5 G2 : -	G1 : souillée à J12
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	31 - 01 - 91 B2 : + à J10	N.R	N.R
Gélose (G)	G2 : + à J4	N.R	N.R
Ensemencement GS	N.R	+	+
Micro-organismes isolés	Mycoplasma hominis	Bacille Gram - Levures	Cocci Gram + type Staphylocoque Tétracoques ou sarcines

RFC 1ère détermination 2ème détermination	25 - 01 - 91 : - N.R	23 - 01 - 91 : - N.R	19 - 01 - 91 : - 31 - 01 - 91 : -
Agglutinines froides	N.R	N.R	N.R

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Antigènes solubles pneumococciques : +	Antigènes solubles - : S. pneumoniae, H. influenzae, N. meningitidis	Lavage broncho- alvéolaire, Hémocultures, ECBU Examens : -
Sérologies	N.R	MNI test : - ASLO-ASD : -	HAV, HBV, HIV, CMV, myxovirus, Chlamydiae, Borrelia Rickettsie, Yersinia Legionella, mycobac- térie... : -

TABLEAU XV : (Suite n°1)

Observations n°	7	8	9
Prélèvement Date Type	24 - 01 - 91 Brosse	07 - 02 - 91 Ecouvillon	05 - 02 - 91 Lavage broncho- alvéolaire
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	24 - 01 - 91 B1 : -	07 - 02 - 91 B1 : +, trouble à J5 repiqué sur MCE (2) B2 : -	05 - 02 - 91 B1 : +, trouble à J7 repiqué sur MCE 2 B2 : -
Gélose (G)	G1 : -	G1 : souillée à J5 G2 : -	G1 : souillée à J16 G2 : -
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R	N.R	N.R
Gélose (G)	N.R	N.R	N.R
Ensemencement GS	N.R	+	-
Micro-organismes isolés	-	Bacille Gram + type Corynebacterie Levures	Champignons fila- menteux Aspergillus

RFC 1ère détermination	21 - 01 - 91 : -	30 - 01 - 91 : + (1/64)	04 - 02 - 91 : -
2ème détermination	14 - 02 - 91 : -	27 - 02 - 91 : + (1/8)	20 - 02 - 91 : -
Agglutinines froides	N.R	-	-

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Hémocultures + : Staphylococcus epidermidis	N.R	LCR hémorragique et culture - Hémocultures + : Escherichia coli (3) BK : -
Sérologies	CMV : + en IgG : 1/40960 IgM : 1/100 Herpès : -	Grippe : + (1/16) Légionella : -	BK : - Herpès : IgG + dans LCR (1/16) et sérique : 1/2560

TABLEAU XV : (Suite n°2)

Observations n°	10	11	12
Prélèvement Date Type	13 - 02 - 91 Expectoration	13 - 02 - 91 Brosse	15 - 02 - 91 Expectoration
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	13 - 02 - 91 B1 : début +, non confirmé, repiqué sur G/MCE (2)	13 - 02 - 91 B1 : +, trouble à J5 repiqué sur MCE 2 B2 : -	15 - 02 - 91 B1 : -, trouble à J3 repiqué MCE (2), MK (1) B2 : -
Gélose (G)	G1 : - G2 : -	G1 : - G2 : -	G1 : + à J7, repiqué sur G/MCE (3) G2 : + G3 : -
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R.	N.R.	23 - 02 - 91 B1 : + à J8
Gélose (G)	N.R.	N.R.	G1 : + à J6
Ensemencement GS	N.R.	-	N.R.
Micro-organismes isolés	-	-	Mycoplasma hominis

RFC 1ère détermination	14 - 02 - 91 : + (1/64)	20 - 02 - 91 : -	15 - 02 - 91 : -
2ème détermination	06 - 03 - 91 : + (1/32)	N.R.	04 - 03 - 91 : -
Agglutinines froides	-	N.R.	N.R.

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Antigènes solubles - : S. pneumoniae, Hae- mophilus influenzae, N. meningitidis C	LCR (purulent), hémocultures + : Listeria monocyto- genes	
Sérologies	Chlamydia et Rickettsie : -	N.R.	HAV, HBV, CMV, Herpès, HIV, grippe Rickettsie : - Chlamydia tracho- matis : + (1/128) Chlam. psittaci : -

TABLEAU XV : (Suite n°3)

Observations n°	13	14	15
Prélèvement Date Type	15 - 02 - 91 Brosse	20 - 02 - 91 LBA	23 - 02 - 91 Expectoration
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	15 - 02 - 91 B1 : -	20 - 02 - 91 B1 : -	23 - 02 - 91 B1 : - trouble à J11, repiqué sur MCE (2) B2 : -, souillure à J19
Gélose (G)	G1 : -, souillée en fin de culture	G1 : -	G1 : - G2 : -, souillure à J19
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R	N.R	N.R
Gélose (G)	N.R	N.R	N.R
Ensemencement GS	+	N.R	-
Micro-organismes isolés	Aspergillus	-	Champignons filamenteux non identifiés

RFC 1ère détermination 2ème détermination	12 - 02 - 91 : - 06 - 03 - 91 : -	20 - 02 - 91 : - N.R	25 - 02 - 91 : - N.R
Agglutinines froides	N.R	-	-

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Fibro-aspiration - : pneumocystis, CMV, légiionella	LBA, Brosse + : S. pneumoniae, H. influenzae, N. me- ningitidis C	ECBC : non signifi- catif Bordet gengou : - Coproculture : -
Sérologies	HAV, HBV, EBV, Aspergillus, toxo- plasmose, legionel- la : - CMV : + en IgG	CMV, VRS, Chlamy- dia : - Coxiella burnetti : + IgG (1/280) Herpès : + en IgG	Chlamydia, Ricket- tsie, Legionella : -

TABLEAU XV : (Suite n°4)

Observations n°	16	17	18
Prélèvement Date Type	26 - 02 - 91 LBA	16 - 03 - 91 Brosse	18 - 03 - 91 Expectoration
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	26 - 02 - 91 B1 : -	16 - 03 - 91 B1 : -	20 - 03 - 91 B1 : -
Gélose (G)	G1 : -	G1 : -	G1 : souillée à J15
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R	N.R	N.R
Gélose (G)	N.R	N.R	N.R
Ensemencement GS	N.R	N.R	+
Micro-organismes isolés	-	-	Levures Champignons fila- menteux non identifiés

RFC 1ère détermination 2ème détermination	26 - 02 - 91 : - 19 - 03 - 91 : -	28 - 03 - 91 : - N.R	19 - 03 - 91 : - N.R
Agglutinines froides	-	-	N.R

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Fibroskopie bron- chiques : sécrétions purulentes, culture : Haemophilus, N. meningitidis Bilan BK : - (culture en cours) LCR, hémocultures :	Hémocultures : - Ponctions pleurales: pleurésie purulente Bilan BK : direct : - culture en cours	N.R
Sérologies			N.R

TABLEAU XV : (Suite n°5)

Observations n°	19	20	21
Prélèvement Date Type	19 - 03 - 91 Brosse	21 - 03 - 91 Brosse	19 - 03 - 91 Expectoration
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	19 - 03 - 91 B1 : -	21 - 03 - 91 B1 : -	19 - 03 - 91 B1 : -
Gélose (G)	G1 : souillée à J15 par champignon	G1 : souillée à J13	G1 : -
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R	N.R	N.R
Gélose (G)	N.R	N.R	N.R
Ensemencement GS	N.R	N.R	N.R
Micro-organismes isolés	Champignons filamenteux non identifiés	Champignons filamenteux non identifiés	-

RFC 1ère détermination 2ème détermination	20 - 03 - 91 : - à venir	N.R N.R	19 - 03 - 91 : - N.R
Agglutinines froides	-	N.R	-

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Brosse protégée, Hémocultures : - Antigènes solubles : -	LCR : purulent, culture : -	ECBC : Streptocoque non hémolytique
Sérologies	N.R	N.R	Légionella : -

TABLEAU XV : (Suite n°6)

Observations n°	22	23	24
Prélèvement Date Type	25 - 03 - 91 Brosse	28 - 03 - 91 Brosse	26 - 03 - 91 FAB
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	25 - 03 - 91 B1 : -, repiqué sur G/MCE (2)	28 - 03 - 91 B1 : -	26 - 03 - 91 B1 : -, trouble à J3 repiqué sur MCE (2) B2 : -
Gélose (G)	G1 : souillée à J4 G2 : -	G1 : souillée à J15	G1 : souillée à J3 G2 : -
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R	N.R	N.R
Gélose (G)	N.R	N.R	N.R
Ensemencement GS	+	N.R	+
Micro-organismes isolés	Bacille Gram - de type Pseudomonas	Champignons fila- menteux non identifiés	Levures

RFC 1ère détermination 2ème détermination	25 - 03 - 91 : - N.R	N.R N.R	N.R N.R
Agglutinines froides	N.R	N.R	N.R

Autres tests Examen direct Culture Antigènes solubles	Fibro. bronchique + : S. pneumoniae Hémocultures + : S. pneumoniae 5 ECBC et fibro : Pseudomonas	Fibro. bronchique, brosse + : Pseudomonas klebsiella	Antigènes solubles - S. pneumoniae , N. meningitidis , H. influenzae Aspiration bron- chique : -
Sérologies	HAV : - Herpès : + en IgG CMV : + en IgG	N.R	Rickettsie : + (1/160) CMV; HBV, Legionella : -

TABLEAU XV : (Suite n°7)

Observation n°	25
Prélèvement Date Type	27 - 03 - 91 FAB
Ensemencement MCE Date Bouillon (B)	27 - 03 - 91 B1 : -, trouble à J2 repiqué sur MCE (2) B2 : -
Gélose (G)	G1 : - G2 : souillée à J15
Ensemencement MK Date Bouillon (B)	N.R
Gélose (G)	N.R
Ensemencement GS	-
Micro-organismes isolés	Champignons filamenteux non identifiés

RFC 1ère détermination 2ème détermination	06 - 03 - 91 : - 02 - 04 - 91 : -
Agglutinines froides	-

Autres tests Examen direct Cultures Antigènes solubles	Hémocultures, ponction péritonéale, Fibro.aspira. + : Staphylococcus aureus Fibro. - : CMV, Pneumocystis
Sérologies	Légionella, HAV, Chlamydia psittaci, Aspergillus : - Herpès : + en IgG (1/2560) CMV : + (1640) Chlamydia trachomatis : + (1/64)

TABLEAU XV : (Suite n°8)

□ Groupe 1
▨ Groupe 2

Années ou %

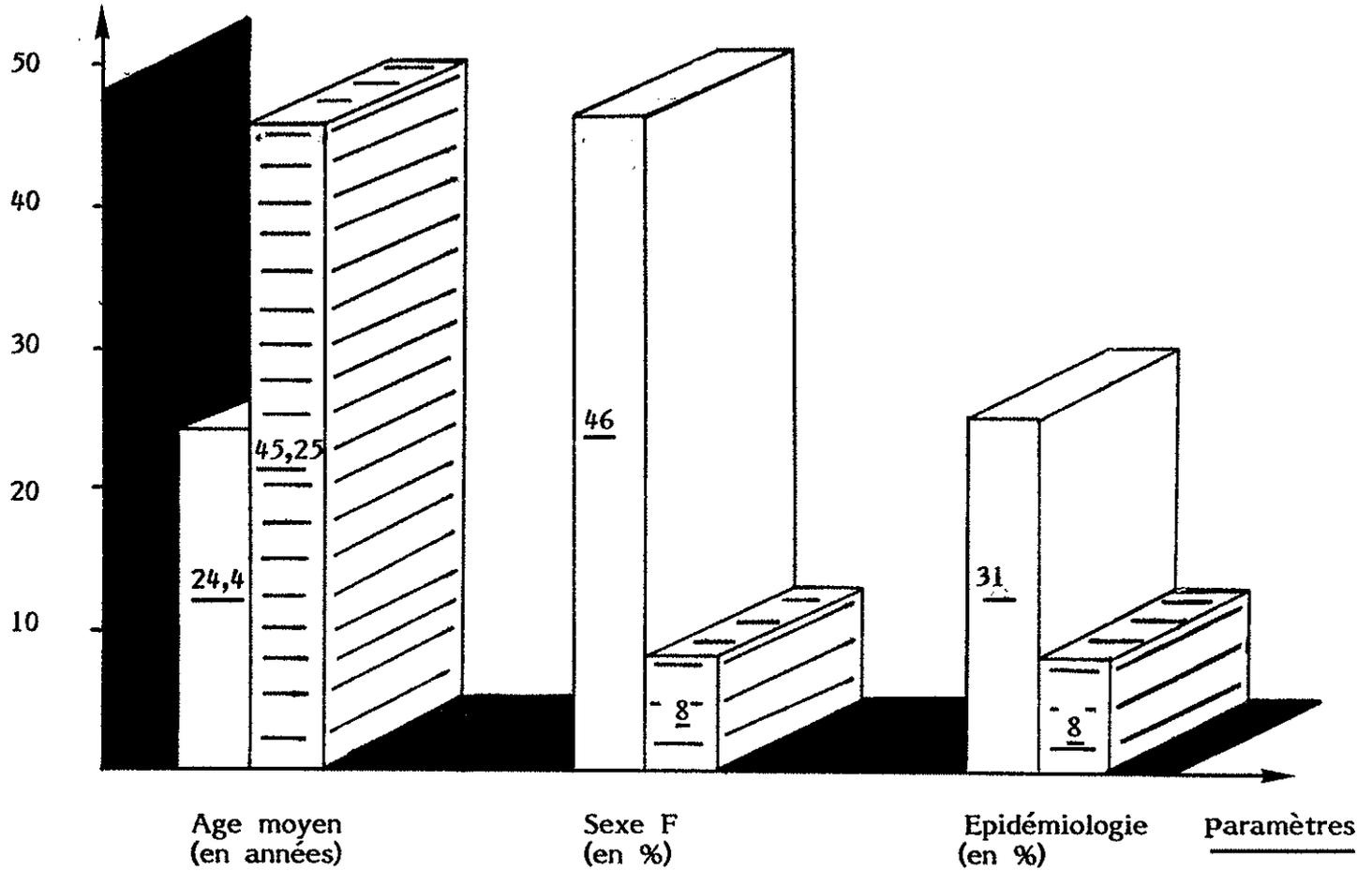


FIGURE 22 : REPRESENTATION GRAPHIQUE ET COMPARAISON
ENTRE LES DEUX GROUPES EN FONCTION
DE L'AGE, DU SEXE ET DE L'EPIDEMIOLOGIE

- 8 % (1/12) sont de sexe féminin,

- l'infection survient dans 83 % des cas (10/12) chez des sujets fragilisés (immunodéprimés thérapeutiques, traumatismes, silico-tuberculose, choc septique) ou porteurs d'une tare (intoxication exogène). Les traitements anti-infectieux sont le plus souvent "lourds" et longs. L'amélioration générale apparaît tardivement et le décès est survenu dans deux cas (observations n° 6 et 25),

- l'étude épidémiologique retrouve chez un patient (observation n° 6) des antécédents personnels infectieux récents.

22- RESULTATS BIOLOGIQUES

221- PRELEVEMENTS

Les types de prélèvements et leurs nombres sont détaillés dans la figure 23.

80 % des prélèvements ont été effectués au plus tard dans les 48 heures qui suivent le diagnostic d'infection broncho-pulmonaire.

Les prélèvements dits "invasifs" (lavage broncho-alvéolaire, brosse, fibro-aspiration bronchique) ont été réalisés essentiellement chez les sujets du groupe 2 (11/12), alors que le prélèvement par expectoration est le plus fréquent chez les sujets du groupe 1 (9/13).

222- CULTURES

Divers micro-organismes ont été isolés après culture sur milieu expérimental (MCE)(figure 24).

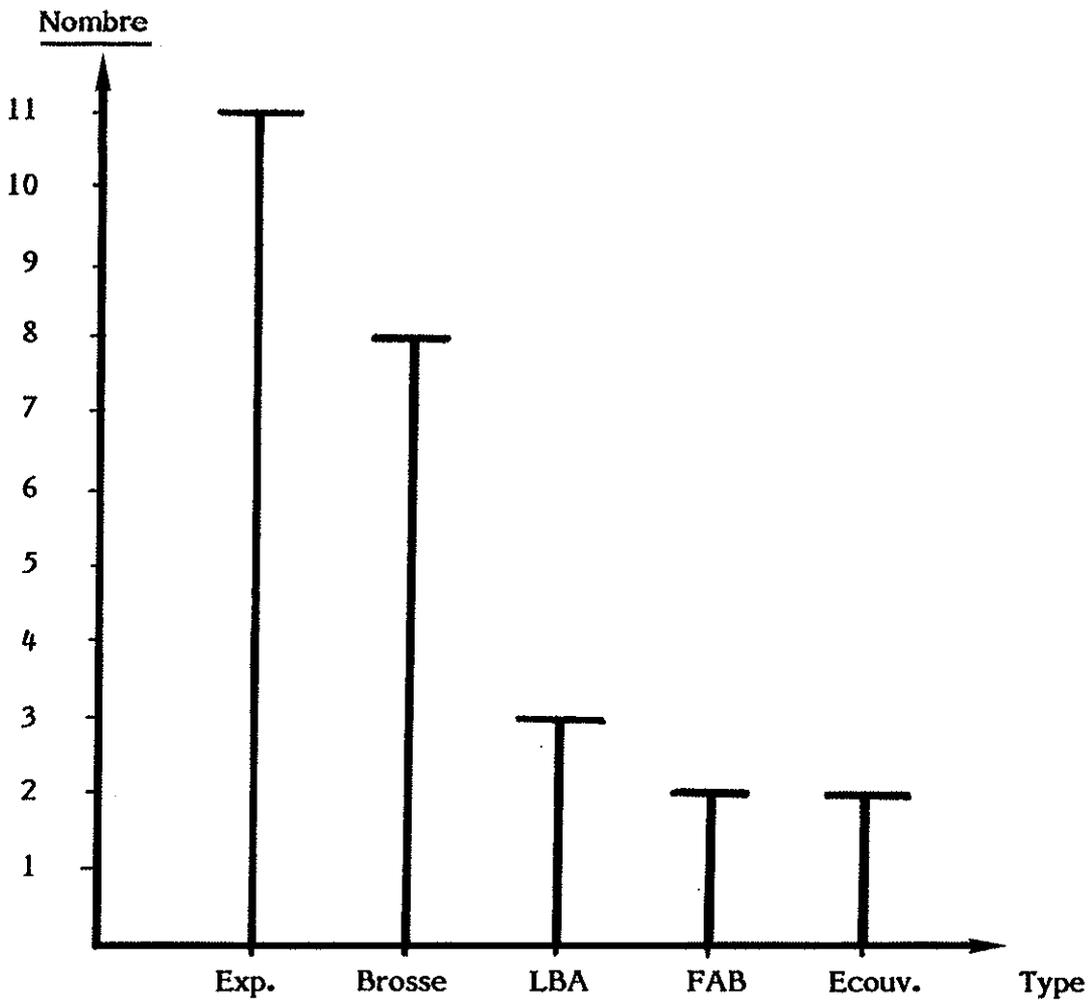


FIGURE 23 : PRELEVEMENTS : TYPE ET NOMBRE

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

FAB : Fibro-Aspiration Bronchique

Exp. : Expectoration

Ecouv. : Ecouvillon

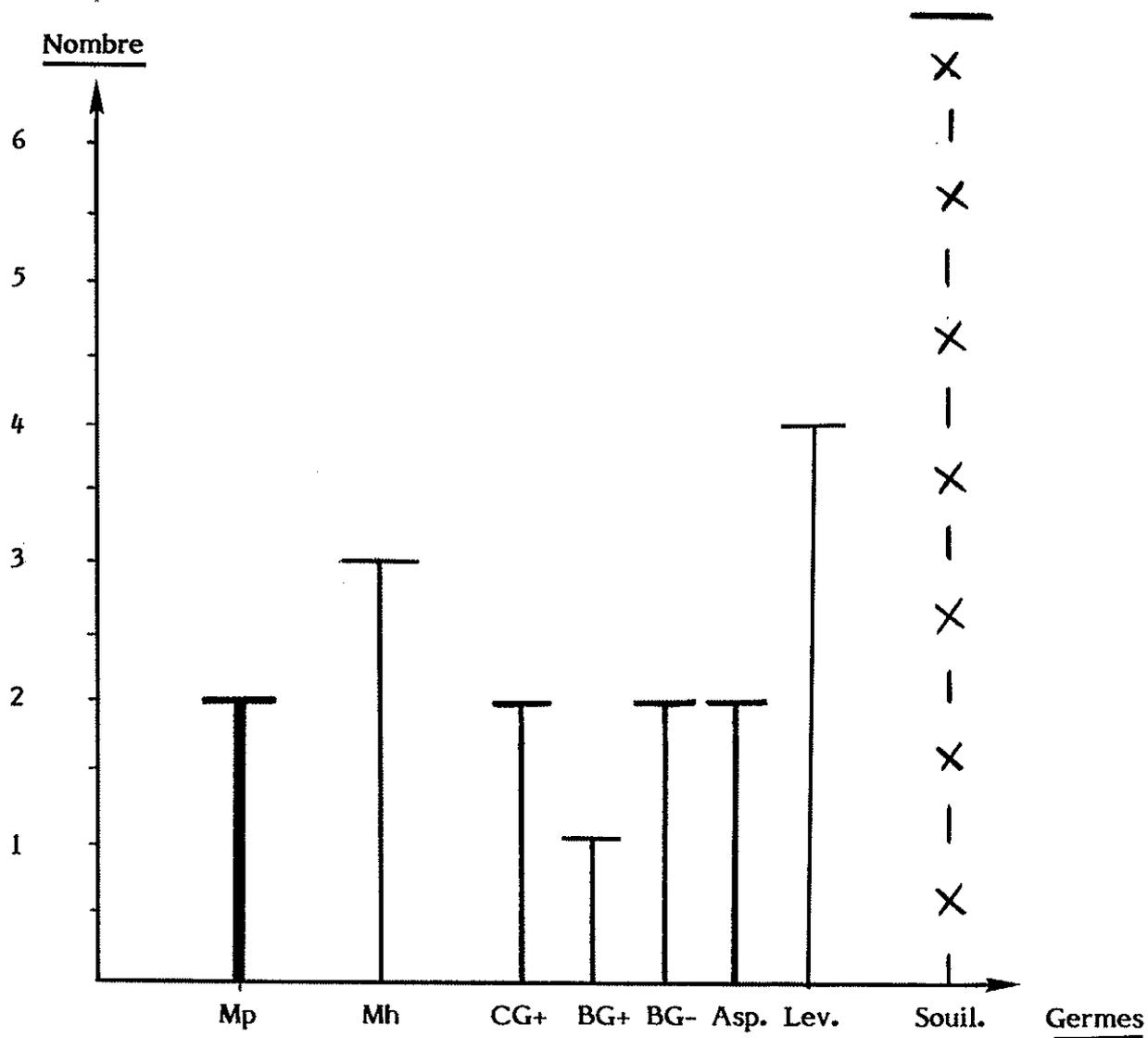


FIGURE 24 : MICRO-ORGANISMES ISOLES SUR MCE

Mp : *Mycoplasma pneumoniae*

Mh : *Mycoplasma hominis*

Asp. : *Aspergillus*

Lev. : Levures

Souil. : Souillures

222-1- MYCOPLASMA PNEUMONIAE (2/25)

1) Observation n° 1 :

- le bouillon vire au jaune à J12 du fait de l'acidification du milieu,
- les colonies apparaissent sur la gélose à J16,
- le repiquage sur **MK**, réalisé tardivement, reste négatif.

2) Observation n° 2 :

- la première culture sur **MCE** est négative. Devant l'apparition d'un trouble du bouillon à J4, nous avons filtré puis réensemencé ce dernier sur **MCE** et **MK**,

- le bouillon **MCE** réensemencé reste négatif alors qu'à J4 apparaissent sur la gélose **MCE** de nombreuses colonies. Au cours de leur développement, ces colonies prennent un aspect disparate : colonies granuleuses, rondes, de grande taille type *Mycoplasma hominis* et colonies dites en "oeuf sur le plat" type *Mycoplasma pneumoniae*,

- le bouillon et la gélose du **MK** se positivent respectivement à J10 et à J22 confirmant la présence de *Mycoplasma hominis*.

222-2- AUTRES MICRO-ORGANISMES

D'autres micro-organismes ont été isolés :

- *Mycoplasma hominis* : 3 souches ont été isolées et repiquées avec succès sur **MK** (3/25, observations n° 2, 4, 12),
- Cocci Gram + (2/25, observations n° 2, 6),
- Bacilles Gram + (1/25, observation n° 8),
- Bacilles Gram - (2/25, observations n° 5, 22),

- Aspergillus (2/25, observations n° 9, 13),
- Levures (4/25, observations n° 5, 8, 18, 24).

Environ 28 % (7/25, observations n° 9, 15, 18, 19, 20, 23, 25) des géloses du MCE étaient souillées par des champignons filamenteux que nous n'avons pas pu identifier. Ces champignons sont apparus en moyenne plus de 13 jours après le début de la culture.

223- REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

La sérologie mycoplasémique (par RFC) a été effectuée chez 22 patients (88 %) dont 13 du groupe 1 (100 %), 9 du groupe 2 (75 %).

Ces patients ont été répartis en 3 classes selon le nombre de déterminations sérologiques réalisées (figure 25).

Il n'y avait pas de différence significative dans la prescription des sérologies entre les groupes 1 et 2.

68 % (15/22) des premières et parfois uniques déterminations étaient concomitantes des cultures.

18 % (4/22) ont été réalisées avant la culture, généralement à titre systématique (observations n° 5, 6, 8, 25).

14 % (3/22) ont été effectuées plus d'une semaine après la mise en culture des prélèvements (observations n° 2, 11, 17).

Sur l'ensemble des sérologies, 3 étaient positives (3/22).

- Observation n° 2 : une seule détermination a été réalisée 15 jours après le début des symptômes. Positive (supérieure au 1/128ème) elle ne peut pas être comparée, du fait de leur absence, aux données sérologiques antérieures, mais le taux élevé des anticorps anti-*Mycoplasma pneumoniae* permet de conclure à une infection récente.

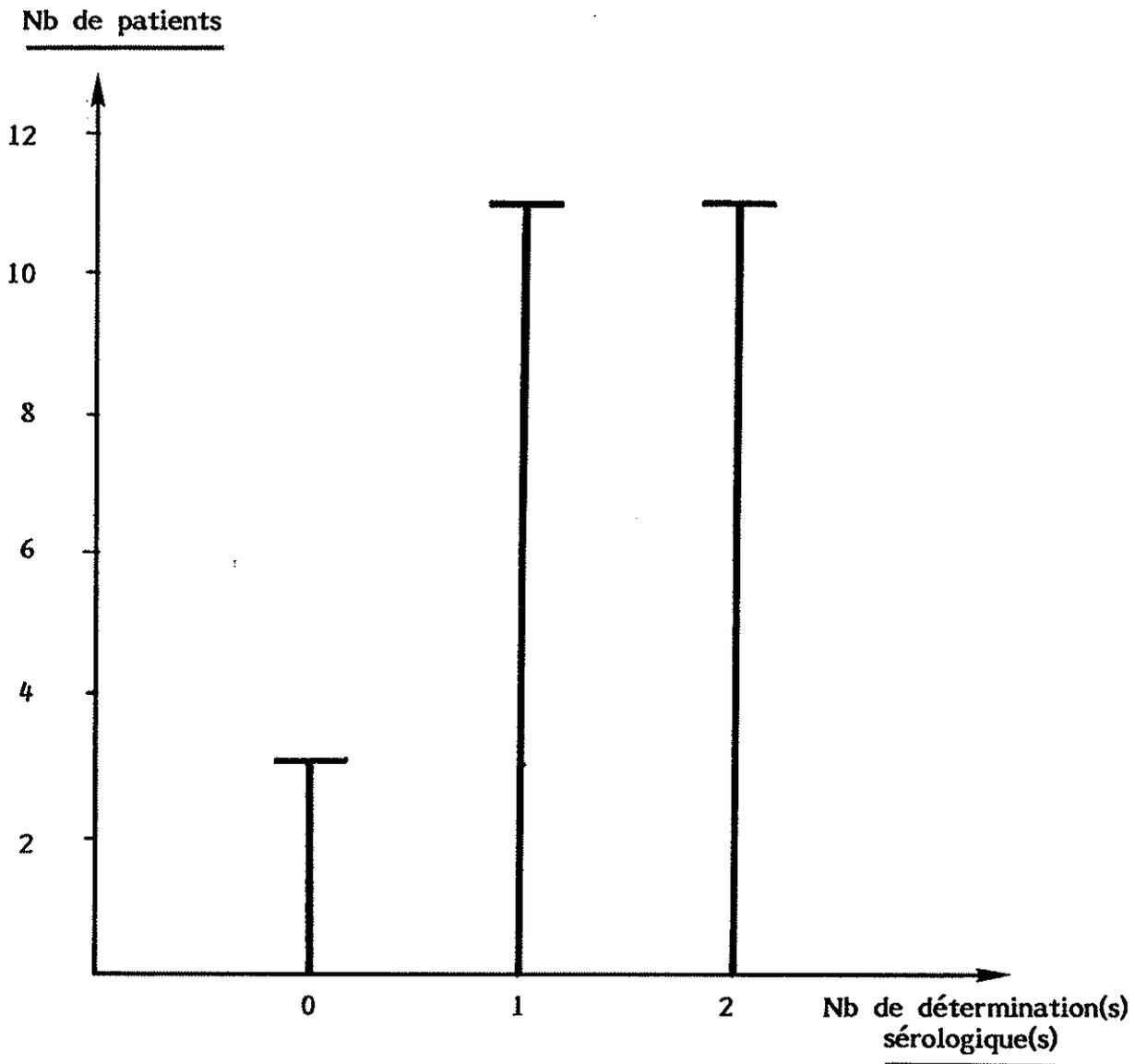


FIGURE 25 : REPARTITION DES PATIENTS SUIVANT LE NOMBRE DE DETERMINATION(S) SEROLOGIQUE(S)

- Observation n° 8 :

- . 1ère détermination : positive (1/64ème),
- . 2ème détermination à 1 mois : positive (1/8ème).

Infection en voie de guérison, réinfection ou réaction croisée (faux positif) ?

- Observation n° 10 :

- . 1ère détermination : positive (1/64ème),
- . 2ème détermination à 3 semaines : positive (1/32ème).

Mêmes possibilités que pour l'observation n° 8. Mais l'efficacité du traitement (amoxicilline) et le jeune âge rendent peu probables l'infection aiguë ou la réinfection par *Mycoplasma pneumoniae*. Il s'agit probablement d'un faux positif (réaction croisée) ou d'une infection ancienne.

224- AGGLUTININES FROIDES

La recherche d'agglutinines froides a été effectuée chez 48 % (12/25) des patients (figure 26) :

- Groupe 1 : 8/13
- Groupe 2 : 4/2

La recherche d'agglutinines froides est positive à la dilution au 1/2 chez un patient (observation n° 2).

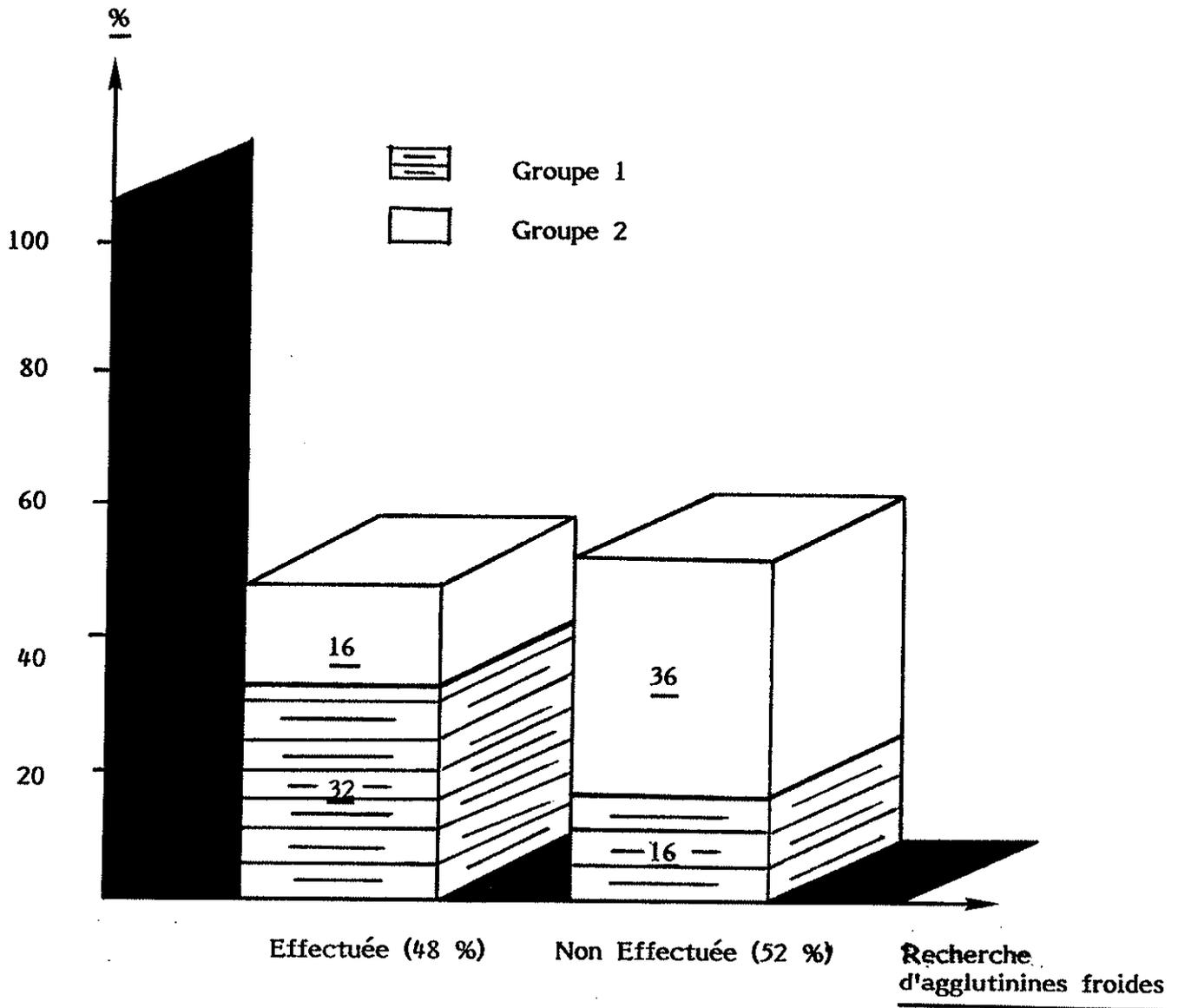


FIGURE 26 : REPARTITION DE LA RECHERCHE D'AGGLUTININES FROIDES (REALISEE OU NON) SUIVANT LES GROUPES DE PATIENTS

23- AUTRES TESTS BIOLOGIQUES EFFECTUES

231- DIAGNOSTIC DIRECT

Ces tests biologiques ont été essentiellement réalisés chez les patients du groupe 2 pour la recherche de l'agent infectieux responsable du tableau clinique.

Les examens les plus fréquemment réalisés étaient :

- hémocultures et recherche des antigènes solubles (11/25, 6/25),
- cytologie et culture du LCR (4/25),
- cytologie et culture des urines (1/25),
- cytologie et culture des prélèvements broncho-pulmonaires (brosses, LBA, FAB, expectorations)(12/25) et pleuraux (1/25).

Des germes variés ont été identifiés :

- Staphylococcus epidermidis (1/25, observation n° 7),
- Escherichia coli(1/25, observation n° 9),
- Listeria monocytogenes (1/25, observation n° 11),
- Streptococcus pneumoniae et/ou Neisseria meningitis C et/ou Haemophilus influenzae (3/25, observations n° 14, 16, 22),
- Pseudomonas aeruginosa et Klebsiella pneumoniae (1/25, observation n° 23),
- Staphylococcus aureus (1/25, observation n° 25).

Tous les prélèvements pour lesquels la recherche d'un germe a été positive ont été réalisés chez des patients du groupe 2 (8/12).

232- DIAGNOSTIC INDIRECT

232-1- DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE BACTERIEN

Les sérologies autres que mycoplasmiques ont été effectuées avec une égale fréquence dans les deux groupes :

Groupe 1 : 8/13,

Groupe 2 : 7/12.

Elles ont été réalisées pour la recherche de chlamydiae, rickettsies et légionnelles.

Le sérodiagnostic des chlamydiae est positif dans 12 % des cas (3/25, observations n° 3, 12, 25).

Le sérodiagnostic de rickettsiose est positif dans 8 % des cas (2/25, observations n° 14, 24).

Le sérodiagnostic de légionellose est négatif.

232-2- DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE VIRAL

Au cours des sérologies CMV et herpétiques effectuées chez 67 % (8/12) des patients du groupe 2 (ces sérologies sont peu réalisées chez les patients du groupe 1 : 1/13), la recherche des IgG est positive dans :

- 16 % des cas pour le CMV (4/25, observations n° 7, 13, 22, 25),
- 16 % des cas pour l'herpès (4/25, observations n° 9, 14, 22, 25).

24- CONCLUSION

Dans le groupe 1 deux tableaux cliniques, confirmés par la biologie, sont en faveur d'une infection pulmonaire à *Mycoplasma pneumoniae* comme le montre

le tableau suivant :

Observation	Clinique	Culture MCE		RFC	Aggl. froides	Evolution sous traitement
		G	B			
N° 1	+	+	+	-	-	+
N° 2	+	-	+	+	+	+

Dans le groupe 2, la recherche de *Mycoplasma pneumoniae* (directe et indirecte) prescrite à titre systématique, se révèle négative dans tous les cas. Toutefois de nombreux germes (bactéries ou virus) ont pu être isolés et identifiés, orientant le diagnostic.

III - DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons évalué un milieu de culture spécifique de *Mycoplasma pneumoniae* et comparé les résultats obtenus avec ce milieu à ceux obtenus avec les tests classiques utilisés au CHU de Limoges.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer si ce nouveau test pouvait s'intégrer à la stratégie diagnostique actuelle.

31- PATIENTS

L'interprétation des résultats a tenu compte de la répartition des patients en deux groupes.

En effet, les patients constituant le groupe 1, volontairement sélectionnés sur des critères cliniques, paracliniques et radiologiques en faveur d'une pneumopathie atypique primitive sont susceptibles de développer une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

Pour les patients appartenant au groupe 2, le diagnostic biologique d'une infection mycoplasmique entre dans le cadre d'un bilan systématique effectué chez des patients sévèrement atteints. Bien que ce groupe présente un biais dans le recrutement des patients, imposant une interprétation individuelle des résultats, il ne nous est pas apparu judicieux de le supprimer puisque certains auteurs s'accordent à reconnaître que 5 % des immunodéprimés admis en unité de soins intensifs sont susceptibles de développer une surinfection mycoplasmique (43).

Nous avons retrouvé une infection broncho-pulmonaire mycoplasmique (confirmée par l'analyse biologique) chez deux patients du groupe 1 (observations n° 1 et 2), ce qui représente 15 % des pneumopathies atypiques primitives étudiées, pourcentage en accord avec la littérature (16, 22, 81, 106).

Chez un des deux patients (observation n° 2), une éruption urticarienne est apparue dans les suites immédiates de l'infection. Cette manifestation cutanée semble liée à la présence de *Mycoplasma pneumoniae*, responsable de ce type de pathologie chez 25 % des patients (22, 27, 43, 81).

Chez les patients du groupe 2 aucun signe clinique ou biologique en faveur d'une infection mycoplasmique n'a été retrouvé. Il nous paraît important de continuer chez ces patients un dépistage à titre systématique pour deux raisons :

1) 5 % des patients immunodéprimés admis en réanimation présenteraient une infection à *Mycoplasma pneumoniae*,

2) un , voire plusieurs germes, sont régulièrement isolés à partir de ces prélèvements, permettant d'étudier la valeur sélective du MCE.

Les données cliniques obtenues au cours de ce travail sont en accord avec la littérature (absence de prédominance liée au sexe, moyenne d'âge, terrain...). Néanmoins, il convient de rester prudent quant à l'interprétation statistique des résultats obtenus à partir d'un échantillon peu représentatif.

32- AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTES MODALITES DE PRELEVEMENTS

Dans l'analyse des résultats biologiques, le premier point important concerne les techniques de prélèvements et leur transport au laboratoire.

L'expectoration est le type de prélèvement le plus fréquent. Simple et rapide, c'est une technique non agressive pouvant se répéter chez le sujet conscient. Effectué avec le concours d'un kinésithérapeute, ce type de prélèvement est fiable et peut être contrôlé par un examen cytologique (7, 29).

Contrairement à certains auteurs (5), l'écouvillonnage de gorge nous paraît plus discutable. En effet, il est :

- effectué à distance du foyer infectieux,
- le plus souvent pauvre en cellules,
- souillé par la flore buccale, au niveau de laquelle on peut retrouver *Mycoplasma pneumonia* et/ou *Mycoplasma hominis* chez des porteurs sains (43).

Aspiration bronchique, brossage endo-bronchique et lavage broncho-alvéolaire sont des prélèvements de meilleure qualité quand ils sont disponibles (6, 10). Cependant, ces prélèvements agressifs, lourds, sont réservés en général aux patients présentant une pathologie broncho-pulmonaire sévère. Ces prélèvements ne peuvent pas être effectués à titre systématique chez des sujets sains ou en bon état général, suspects d'infection mycoplasmaïque.

Au cours de notre étude, les deux souches de *Mycoplasma pneumoniae* ont été isolées à partir d'expectorations.

L'expectoration nous paraît être, en milieu hospitalier avec le concours des kinésithérapeutes, le type de prélèvement le plus adapté dans l'étude biologique des affections broncho-pulmonaires à *Mycoplasma pneumoniae*.

Les délais et conditions de transport ont été difficiles à préciser, aussi nous paraît-il indispensable pour améliorer la qualité et le "rendement" de ces prélèvements d'être le plus strict possible sur ces conditions, voire d'utiliser des milieux de survie (5, 10).

33- INTERET DU MILIEU DE CULTURE EXPERIMENTAL

La composition du milieu de culture expérimental que nous avons testé au cours de ce travail ne nous a pas été communiquée. Il ne nous est donc pas possible de le comparer aux autres milieux actuellement disponibles (30, 46, 93, 107).

Ce milieu utilisé 37 fois au cours de l'étude (25 cultures de première intention, 12 repiquages) est pratique, simple et rapide. Il se conserve bien à +4°C.

Deux souches de *Mycoplasma pneumoniae* ont été isolées après culture sur ce milieu expérimental (observations n° 1 et 2) :

- la souche n° 1 a été isolée à J12 à partir du bouillon et à J16 à partir de la gélose,
- la souche n° 2 n'a été isolée qu'après repiquage sur gélose, à J8, le bouillon restant négatif.

Une première analyse des résultats amène à plusieurs constatations :

- la sensibilité du milieu doit être améliorée. En effet, dans le cas de l'observation n° 2, l'isolement a nécessité un repiquage du bouillon sur gélose, la primo-culture étant restée négative à J20,

- le délai de culture est long : les souches isolées n'apparaissent qu'entre J8 et J12, limitant l'intérêt diagnostique et surtout thérapeutique de ce test,
- l'absence de moyens d'analyse objectifs, nécessaires dans les cas limites tel celui de l'observation n° 2 où la souche ne s'est développée qu'après repiquage sur gélose. Le diagnostic repose alors sur l'aspect caractéristique mais subjectif en "oeuf sur le plat" des colonies et sur les résultats sérologiques. Quelle aurait été la solution si cela s'était présenté avec la souche n° 1 où les résultats sérologiques (RFC, agglutinines froides) sont négatifs ?

La croissance de souches bactériennes, de champignons et de souillures remet en question la valeur sélective et la spécificité de ce MCE. De plus, comme nous l'avons souligné dans les observations n° 5, 8, 9 et 11, le développement de contaminants dans le bouillon peut, en abaissant le pH, faire virer l'indicateur coloré, posant ainsi des problèmes d'interprétation.

Une interrogation persiste concernant la facilité de croissance de *Mycoplasma pneumoniae* sur une gélose et dans un bouillon contaminés et/ou souillés. En effet, *Mycoplasma pneumoniae* est un micro-organisme fragile, difficile à cultiver sur des milieux complexes. Aussi la croissance simultanée de contaminants et/ou de souillures peut, en consommant les constituants de base, interférer avec celle de *Mycoplasma pneumoniae*.

Pour rendre ce test plus performant, il nous paraît indispensable au vu de cette étude, de développer à court terme :

- sa sélectivité et sa spécificité afin de faciliter le diagnostic en éliminant faux positifs et faux négatifs,
- des moyens de diagnostic objectifs facilitant l'identification de *Mycoplasma pneumoniae* dans les cas limites, tels que :

- . hémolyse et hémadsorption des hématies de cobayes (22, 78),
- . immunofluorescence directe sur gélose (3, 22, 78),
- . sondes moléculaires (6),

- la sensibilité et le délai de culture seront beaucoup plus difficiles à améliorer.

34- INTERET DES AUTRES TESTS EFFECTUES

Pour étudier la validité du MCE, nous avons utilisé d'autres tests biologiques existant au CHU afin de comparer les résultats obtenus.

Deux types de tests ont été étudiés : des tests spécifiques de *Mycoplasma pneumoniae* (RFC, agglutinines froides), et des tests non spécifiques de *Mycoplasma pneumoniae* mais présentant un intérêt dans l'orientation du diagnostic clinique.

341- TESTS SPECIFIQUES DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE

341-1- REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

La RFC est encore l'une des méthodes diagnostiques sérologiques la plus utilisée mais aussi la plus critiquée du fait de son manque de sensibilité et de spécificité (réactions croisées)(3, 22, 69).

Au cours de ce travail, trois sérologies mycoplasmiques se sont révélées positives.

- Dans l'observation n° 2, le premier et unique prélèvement effectué 14 jours après le diagnostic clinique de pneumopathie était positif au 1/128ème.

- Dans l'observation n° 8, le premier prélèvement, contemporain du diagnostic clinique, était positif au 1/64ème et le 2ème prélèvement, effectué

29 jours plus tard, était positif au 1/8ème.

- Dans l'observation n° 10, le premier prélèvement, contemporain du diagnostic clinique et de la culture, était positif au 1/64ème et le deuxième prélèvement, effectué 3 semaines plus tard, était positif au 1/32ème.

L'analyse de ces résultats amène plusieurs commentaires.

- Problème de la sensibilité du test : sur les deux patients pour lesquels la culture sur MCE a permis l'isolement de *Mycoplasma pneumoniae*, un seul présente une sérologie mycoplasmaïque positive (observation n° 2). Au vu des signes cliniques et biologiques, l'origine mycoplasmaïque de l'infection présentée par le patient n° 1 est plus que probable. Il semble donc que seul un manque de sensibilité de la technique de RFC puisse expliquer ce résultat négatif.

- Problème de la spécificité du test : chez un des patients (observation n° 10), les sérologies positives peuvent correspondre à une stimulation mycoplasmaïque récente ou à un faux positif dû à une réaction croisée. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible devant le tableau clinique et l'absence de signe biologique.

- Problème de l'utilisation des tests biologiques :

- . un seul prélèvement a été effectué à J14 chez le patient n° 2. Il est difficile, voire impossible dans ces conditions de suivre l'évolution des anticorps et de différencier une primo-infection d'une réinfection,
- . les deux sérologies effectuées chez le patient n° 8 permettent d'observer une baisse significative du taux des anticorps. L'écouvillonnage de gorge effectué à J12 après le diagnostic clinique de pneumopathie et la mise sous roxithromycine ne présente aucun intérêt diagnostique. Il ne nous paraît pas possible sur ces données biologiques de différencier l'origine

mycoplasmique de l'infection par un autre germe.

Par les résultats de ce test, il nous paraît essentiel :

- de définir une logique "stratégique" dans le diagnostic biologique des infections à *Mycoplasma pneumoniae* afin de disposer en temps voulu des prélèvements nécessaires au diagnostic,

- de développer de nouveaux tests sérologiques plus fiables et plus performants afin de remplacer la RFC. Certains de ces tests mettent à profit les connaissances récentes sur la structure antigénique de *Mycoplasma pneumoniae* :

- . Dot-ELISA (57),
- . IFI (15),
- . test d'inhibition de l'adhésion (6, 56).

341-2- AGGLUTININES FROIDES

La recherche d'agglutinines froides fut l'un des premiers tests diagnostiques utilisés. Il est simple et rapide, mais son manque de sensibilité et de spécificité limite son intérêt pour le diagnostic. Il demeure cependant un bon test d'orientation diagnostique.

Au cours de notre étude, la recherche d'agglutinines froides s'est révélée positive chez un seul patient (observation n° 2). Ce résultat positif cadre parfaitement avec le tableau clinique et biologique.

Par contre, l'absence d'agglutinines froides chez le sujet n° 1 confirme bien le manque de sensibilité de ce test.

342- TESTS NON SPECIFIQUES DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Ces nombreux tests biologiques (directs et indirects) ont été d'un apport non négligeable dans l'orientation diagnostique du tableau infectieux. En effet, il est apparu intéressant, lors de notre étude, de tenter de définir avec le plus de précision possible l'agent causal afin d'offrir un support comparatif le plus complet possible entre les deux groupes de patients étudiés.

Si ces examens complémentaires offrent peu d'intérêt pour le groupe 1, ils sont de première importance pour le groupe 2 où une approche, voire un diagnostic biologique a pu être obtenu dans la majorité des cas, confirmant les résultats négatifs observés lors de la recherche de *Mycoplasma pneumoniae* (vrais négatifs).

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Le diagnostic biologique d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae* repose au CHU de Limoges sur la culture, la sérologie mycoplasmaïque effectuée par RFC et la recherche d'agglutinines froides. Le délai nécessaire au diagnostic et l'absence de tests fiables rendent difficile et parfois aléatoire le diagnostic de certitude d'une infection mycoplasmaïque. Aussi nous paraît-il nécessaire de développer à court terme des tests (directs et indirects) performants et rapides.

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis récemment la mise au point de différents tests de diagnostic, tests qui sont ou seront commercialisés dans un avenir proche :

- diagnostic direct : sondes moléculaires, anticorps monoclonaux, PCR permettent en 48 heures l'identification des *Mycoplasma pneumoniae* à partir des prélèvements ou des milieux de culture,

- diagnostic indirect : utilisant des antigènes spécifiques, purifiés, très immunogènes (ELISA, agglutination latex,...).

Toutefois il convient de rester prudent car si l'utilisation des nouveaux tests sérologiques donne de bons résultats (sensibilité, fiabilité), l'utilisation de tests diagnostics directs, quant à elle, se heurte encore à de nombreux problèmes :

- . fiabilité du diagnostic (surtout pour les sondes),
- . prix de revient élevé,
- . disponibilité. Il est difficile, voire impossible d'obtenir de certains laboratoires censés avoir développé ou commercialisé des sondes moléculaires, des renseignements techniques (structure, présentation, matériel nécessaire, conditions d'utilisation) et des renseignements commerciaux (prix,

conditions de livraison, délais).

Quoiqu'il en soit, devant la fréquence des pneumopathies atypiques primitives à *Mycoplasma pneumoniae*, il nous paraît souhaitable de développer une "stratégie" de diagnostic logique (diagnostics directs et sérologiques concomittants, sérologie définie sur deux prélèvements) rapide et fiable, permettant au clinicien de disposer du diagnostic rapide afin d'adapter le traitement. Le diagnostic sérologique, toujours indispensable, permettra de confirmer en une dizaine de jours, l'origine mycoplasmique de l'infection.

Une inconnue persiste concernant les cultures mycoplasmiques. Actuellement indispensables, elles sont susceptibles à court terme de laisser leur place à des tests diagnostiques aussi performants mais plus rapides ; toutefois la faisabilité de techniques à priori les plus prometteuses comme l'amplification génique (PCR) en terme de temps, de personnel qualifié et de coût, reste à démontrer.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **ABRAMOWITZ P., SCHARTZMAN P., HAREL D., LIS I., NAOT Y.**
Direct invasion of the central nervous system by *Mycoplasma pneumoniae* : A report of two cases.
J. Inf. Dis., 1987, 155:482-486.
- 2 - **Anonyme**
Mycoplasma pneumoniae.
Lancet, 1991, 337:651-652.
- 3 - **AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H.**
Mycoplasma-Ureaplasma.
In "*Bactériologie Clinique*", Ellipses, Marketing Ed, Paris, 1988:463-473.
- 4 - **BARKER C.E., SILLIS M., WREGHITT T.G.**
Evaluation of Serodia-Myco II particle agglutination test for detecting *Mycoplasma pneumoniae* antibody : comparison with mu-capture ELISA and indirect immunofluorescence.
J. Clin. Pathol., 1990, 43:163-165.
- 5 - **BEBEAR C.**
Diagnostic biologique des infections respiratoires à *Mycoplasma pneumoniae*.
Rev. Mal. Resp., 1986, 3:67-71.
- 6 - **BEBEAR C., DE BARBEYRAC B., BERNET C., RENAUDIN H.**
Méthodes d'exploration des infections à Mycoplasmes.
Ann. Biol. Clin., 1989, 47:415-420.
- 7 - **BERGOGNE-BEREZIN E.**
Examen cyto-bactériologique de l'expectoration : Technique, indications, interprétation et limites.
Lettre Infect., 1991, 6:9-13.
- 8 - **BERNET C., GARRET M., DE BARBEYRAC B., BEBEAR C., BONNET J.**
Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the Polymerase Chain Reaction.
J. Clin. Microb., 1989, 11:2492-2497.
- 9 - **BOLTRO E., CANAVOSO P., GIVONE C.**
Aspects radiologiques des localisations pulmonaires du *Mycoplasma pneumoniae*.
Sem. Hôp. Paris, 1980, 56:1203-1207.
- 10 - **BONISSOL**
Diagnostic pour l'isolement des mycoplasmes dans les maladies infectieuses.
Congrès de Microbiologie, Cadix, 1979 : 11-14.
- 11 - **BONNAUD F.**
Atteintes infectieuses pulmonaires.
In "*Révision accélérée en pneumologie*",
SA Maloine Ed, Paris, 1986:102-120.

- 12 - **BREDT W., KLEINMANN B., JACOBS E.**
Antibodies in the sera of *Mycoplasma pneumoniae* infected patients against proteins of *Mycoplasma genitalium* and other *Mycoplasma* of man.
Zbl. Bakt Hyg., 1987, A266:32-42.
- 13 - **BRUNNER H., SCHIEFER H.G., KRAUSS H.**
Pathophysiology of *Mycoplasma pneumoniae* infection.
Rev. Fr. Mal. Resp., 1977, 5:609-620.
- 14 - **BUSOLO F., MELONI G.A.**
Serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections by enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Yale Biol. Med, 1983, 56:517-521.
- 15 - **CARTER J.B., CARTER S.L.**
Acute-phase, indirect fluorescent antibody procedure for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection.
Ann. Clin. Lab. Sci., 1983, 13:150-155.
- 16 - **CASELL G.H., COLE B.C.**
Mycoplasmas as agents of human disease.
New Engl. J. Med., 1981, 304:80-89.
- 17 - **CAZENAVE-ROBLOT F., UNDERNER M., ROBLOT P., BREUX J.P., MARECHAUD R., PATTE F., CASTETS M., BECQ-GIRAUDON B.**
Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des pneumopathies dites atypiques.
Med. Mal. Inf., 1987, 12:695-700.
- 18 - **CHANOCK R.M., JAMES W.D., FOX H.H., TURNER H.C., MUFSON M.A., HAYFLICK L.**
Growth of Eaton PPLO in broth and preparation of complement fixing antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 110:884-889.
- 19 - **CHRISTIANSEN C.**
The *Mycoplasma* genome, Part 1.
Microbiol. Sci., 1987, 4:168-172.
- 20 - **CIMOLAI N., MAH D., THOMAS E., MIDDLETON P.S.**
Rapid immunoblot method for diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1990, 9:223-226.
- 21 - **COLMAN S.D., HU P.C., BOTT K.F.**
Prevalence of novel repeat sequences in and around the P1 operon in the genome of *Mycoplasma pneumoniae*.
Gène, 1990, 87:91-96.

- 22 - **COUCH R.B.**
Mycoplasma diseases.
In "Principles and practice of Infectious Diseases", Churchill Livingstone
Ed, New York, 1990:1445-1458.
- 23 - **COURCOL R.**
Interactions entre la muqueuse respiratoire et les bactéries.
Lettre Infect., 1990, 5:492.
- 24 - **DALLO S.F., HORTON J.R., SU C.J., BASEMAN J.B.**
Homologous regions shared by adhesin genes of Mycoplasma pneumoniae
and Mycoplasma genitalium.
Microb. Pathol., 1989, 6 :69-73.
- 25 - **DALLO S.F., HORTON J.R., SU C.J., BASEMAN J.B.**
Restriction fragment length polymorphism in the cytoadhesin PI gene of
human clinical isolates of Mycoplasma pneumoniae.
Infect. Immun., 1990, 58:2017-2020.
- 26 - **DAVIS C.P., COCHRAN S., LISSE J., BUCK G., DINUZZO A.R.,
WEBER T., REINARZ J.A.**
Isolation of Mycoplasma pneumoniae from synovial fluid samples in a
patient with pneumonia and polyarthritis.
Arch. Intern. Med., 1988, 148:969-970.
- 27 - **DAYAN J.**
Les sondes d'acides nucléiques.
Rev. fr Lab., 1988, 175:49-57.
- 28 - **DE BARBEYRAC B., BEBEAR C.**
Application de la biologie moléculaire en bactériologie médicale.
Rev. Fr lab., 1990, 209:111-117.
- 29 - **DELHOUME J.Y.**
Pneumopathie secondaire en réanimation.
Identification du micro-organisme responsable.
Thèse de Médecine, Limoges, 1985.
- 30 - **Diagnostics Pasteur**
Milieux de culture.
Mycoplasma pneumoniae.
In "Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur, Microbiologie-Immunologie",
Graphic Ed, Paris, 1987:138-140.
- 31 - **Diagnostics Pasteur**
Recherche d'anticorps et d'antigènes.
Pneumopathies à Mycoplasme.
In "Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur, Microbiologie-Immunologie",
Graphic Ed, Paris, 1987:455-467

- 32 - **DOURNON E., BRUNOD M., VEZINET F.**
Maladie des légionnaires. Absence de faux positifs de la réaction d'IFI au cours des infections à *Mycoplasma pneumoniae*.
Nouv. Press. Med., 1980, 9:3098.
- 33 - **DOWDLE W.R., ROBINSON R.Q.**
An indirect hemagglutination test for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 116:947-951.
- 34 - **DRUEL B., FRENEY J.**
Utilisation des sondes nucléiques en bactériologie.
Eurobiologiste, 1990, 24:127-154.
- 35 - **DULAR R., KAJIOKA R., KASATIYA S.**
Comparison of Gen-probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection.
J. Clin. Microbiol., 1988, 26:1068-1069.
- 36 - **DUVERLIE G.**
Virologie fondamentale (pathogénie du VIH).
Lettre Infect., 1990, 5:583-585.
- 37 - **DYBVIG K.**
Mycoplasma genetics.
Annu. Rev. Microbiol., 1990, 44:81-104.
- 38 - **ECHEVARRIA J.M., LEON P., BAFALGON B., LOPEZ J.A., FERNANDEZ M.V.**
Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by microparticle agglutination and antibody capture enzyme-immunoassay.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1990, 9:217-220.
- 39 - **FELDNER J., GOBEL U., BREDT W.**
Mycoplasma pneumoniae adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody.
Nature, 1982, 298:765-767.
- 40 - **FOY H.M., KENNY G.E., COONEY M.K., ALLAN I.D., VAN BELLE G.**
Naturally acquired immunity to pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Inf. Dis., 1983, 147:967-973.
- 41 - **GARO B., GARRE M., QUIOT J.J., BOLES J.M., BECQ-GIRAUDON B., CHENNEBAULT J.M., CHOUTET P., MICHELET C., RAFFI F., WEINBRECK P.**
Les aspects des infections à *Mycoplasma pneumoniae*.
Presse Med., 1988, 17:1475-1478.
- 42 - **GAUDIN O.G., OGIER G., GILIBERT A., POZZETTO B.**
Incidence de l'infection à *Mycoplasma pneumoniae* dans une population de malades hospitalisés au cours d'une épidémie.
Path. Biol., 1986, 34:240-244.

- 43 - **GAUDIN O.G.**
Infections humaines à mycoplasmes.
Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Maladies Infectieuses, 8039 Vol 10,
1989, 8:1-6.
- 44 - **GOBEL U.B., GEISER A., STANBRIDGE E.J.**
Oligonucléotide probes complementary to variable regions of ribosomal
RNA discriminate between Mycoplasma species.
J. Gen. Microbiol., 1987, 133:1969-1974.
- 45 - **GRALL P.**
Les mycoplasmes.
Thèses de Pharmacie, Paris XI, 1986.
- 46 - **GRANATO P.A., POE L., WEINER L.B.**
Use to modified New York City Medium for growth of Mycoplasma
pneumoniae.
Am. J. Clin. Pathol., 1980, 73:702-705.
- 47 - **GRIMONT P.A.D.**
Identification bactérienne par hybridation des acides nucléiques.
Spectra Biol., 1987, 87:43-46.
- 48 - **GUESDON J.L.**
La méthode d'hybridation moléculaire non radioactive.
Ass. Anc. El. Inst. Pasteur, 1990, 32:27-29.
- 49 - **HISCHBERG L., HOLME T., HYDEN N.**
Demonstration of membrane association and surface location of
Mycoplasma pneumoniae antigens using monoclonal antibodies.
J. Gen. Microbiol., 1989, 135:613-621.
- 50 - **HOLMBERG H., BODIN L., JONSSON I., KROOK A.**
Rapid aetiological diagnosis of pneumonia based on routine laboratory
features.
Scand. J. Infect. Dis., 1990, 22:537-545.
- 51 - **HU P.C., HUANG C.H. COLLIER A.M., CLYDE W.A.**
Demonstration of antibodies to Mycoplasma pneumoniae attachment
protein in human sera and respiratory secretions.
Infect. Immun., 1983, 41:437-439.
- 52 - **HU P.C., POWELL D.A., ALBRIGHT A., GARONER D.E.,
COLLIER A.M., CLYDE W.A.**
A solid-phase radioimmunoassay for detection of antibodies against
Mycoplasma pneumoniae.
J. Clin. Lab. Immunol., 1983, 11:209-213.
- 53 - **HUTCHINSON C.L., RYTELM W.**
Respiratory agents.
In "Rapid diagnosis in infectious disease", CRC Press Ed, USA, 1979:
146-147.

- 54 - **HYMAN H.C., YOGEV D., RAZIN S.**
DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.
J. Clin. Microbiol., 1987, 25:726-728.
- 55 - **INAMINE J.M., HO K.C., LOECHEL S., HU P.C.**
Evidence that UGA is read as a Tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma gallisepticum*.
J. Bacteriol., 1990, 172:504-509.
- 56 - **JACOBS E., SCHOPPERLE K., BREDT W.**
Adherence inhibition assay : a specific serological test for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*.
Eur. J. Clin. Microbiol., 1985, 4:113-118.
- 57 - **JACOBS E., FUCHTE K., BREDT W.**
A 168 kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae* used as antigen in a dot enzyme-linked immunosorbent assay.
Eur. J. Clin. Microbiol., 1985, 5:435-440.
- 58 - **JACOBS E., BENNEWITZ A., BREDT W.**
Reaction pattern of human anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays and immunoblotting.
J. Clin. Microbiol., 1986, 23:517-522.
- 59 - **JENSEN J.S., SONDERGARO-ANDERSEN J., ULDUM S.A., LIND K.**
Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical samples by Polymerase Chain Reaction.
APMIS, 1989, 97:1046-1048.
- 60 - **JENSEN K.E.**
Measurement of growth-inhibiting antibody for *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Bact., 1963, 86:1349-1350.
- 61 - **JENSEN K.E.**
Antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* inhibition of tetrazolium reduction.
Bact. Proc., 1964 : 70.
- 62 - **KENNY G.E., GRAYSTON J.T.**
Eaton pleuropneumoniae like organism complement fixing antigen : extraction with organic solvents.
J. Immunol., 1965, 95:19-25.
- 63 - **KENNY G.E., CARTWRIGHT F.D.**
Immunoblotting for determination of the antigenic specificities of antibodies to the Mycoplasmatales.
Isr. J. Med. Sci., 1984, 20:908-911.
- 64 - **KENNY G.E., CARTWRIGHT F.D.**
Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to several new Quinolones, Tetracyclines and Erythromycin.
Antimicrob. Agents Chemother., 1991, 3:587-589.

- 65 - **KINGSBURY D.T.**
Rapid detection of Mycoplasmas with DNA probes.
In "Rapid detection and identification on infectious agents", Academic Press Ed, USA, 1985:219-233.
- 66 - **KLEEMOLA S.R.M., KARJALAINEN J.E., RATY R.K.H.**
Rapid diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection : clinical evaluation of a commercial probe test.
J. Infect. Dis., 1990, 162:70-75.
- 67 - **KODJO A.**
Les mollicutes : vers une taxonomie philogénique ?
Institut Pasteur : cours de bactériologie, 1991:30.
- 68 - **KOK T.W., WARKANIS G., MARMION B.P., MARTIN J., ESTERMAN A.**
Direct detection of antigen in respiratory exudates by enzyme immunoassay.
Epidemiol. Inf., 1988, 101:669-684.
- 69 - **KOK T.W., MARMION B.P., WARKANIS G., WORSWICK D.A., MARTIN J.**
Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. Detection of IgM antibodies to Mycoplasma pneumoniae by a modified indirect haemagglutination test.
Epidemiol. Inf., 1989, 103:613-623.
- 70 - **KOTANI H., HUANG H., Mc GARRITY G.J.**
Identification and isolation of Mycoplasmas by immunobinding.
Isr J. Med. Sci., 1987, 23:752-758.
- 71 - **LARZUL D.**
Réaction de polymérisation en chaîne : principe, intérêt et limites.
Ass. Anc. Inst. Pasteur, 1990, 32:30.
- 72 - **LEBACQ P.**
Les sondes nucléiques froides et leurs applications diagnostiques.
Spectra Biol., 1988, 88:33-38.
- 73 - **LEE S.H., CHAROENYING S., BRENNAN T., MARKOWSKI M., MAYO D.R.**
Comparative studies of three serologic methods for the measurement of Mycoplasma pneumoniae antibodies.
Am. J. Clin. Pathol., 1989, 92:342-348.
- 74 - **LIU C.**
Localization, isolation and cultivation of a virus in chick embryos.
Exp. Med., 1957, 106:455-466.
- 75 - **LUCAS E.**
Pneumopathies à Mycoplasma pneumoniae.
Thèse de Médecine, Lyon, 1987.

- 76 - **MADSEN R.D., SAEED F.A., GRAY O., FENDLY M.B., COATES S.R.**
Species specific monoclonal antibody to a 43 000 molecular weight membrane protein of *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Clin. Microbiol., 1986, 24:680-683.
- 77 - **MADSEN R.D., SAEED F.A., COATES S.R.**
The simultaneous direct detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* antigens in sputum specimens by a monoclonal antibody immunoblot assay.
J. Immunol. Methods, 1987, 103:205-210.
- 78 - **Mc GARRITY G.J., KOTANI H.**
Mycoplasmas.
In "Antigen detection to diagnose bacterial infection", CRC Press Ed, Boca Raton, 1986, 3:169-179.
- 79 - **MICHEL D., LAURENT B., GRANOUILLET R., GAUDIN-TERRASSE O.D.**
Infections aiguës récentes et parfois persistantes à *Mycoplasma pneumoniae* associées à des manifestations neurologiques.
Rev. Neurol., 1981, 137:393-412.
- 80 - **MIGUERES J., JOVER A.**
Pneumopathies à *Mycoplasma pneumoniae*.
Rev. Prat., 1974, 24 : 3297-3308.
- 81 - **MOUTON Y., BEAUCAIRE G., DEBOSCHER Y., FOURRIER A.**
Infections broncho-pulmonaires dues à d'autres agents bactériens
In : "Les infections broncho-pulmonaires de l'adulte", Pil Ed, Paris, 1985:51-54.
- 82 - **NAFTALIN J.M., WELLISCH G., KAHANA Z., DIENGOTT D.**
Mycoplasma pneumoniae septicemia.
JAMA, 1974, 228 : 565.
- 83 - **NAGAYAMA Y., SAKURAI N., YAMAMOTO K., HONDA A., MAKUTA M., SUZUKI R.**
Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from children with lower respiratory tract infections.
J. Infect. Dis., 1988, 157 : 911-917.
- 84 - **NAKAYAMA T., URANO T., OSANO M., MAEHARA N., MAKINO S.**
Alpha-interferon in the sera of patients infected with *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Infect. Dis., 1986, 154 : 904-905.
- 85 - **PAPIEROK G., DEFIVES C., DAUNIZEAU A., WATTRE P., DERIEUX J.C.**
Preparative electroelution of specific protein antigens from *Mycoplasma pneumoniae* : use in an enzyme linked immunosorbent assay.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 1983, 139 : 589-603.

- 86 - **PAPIEROK G., SYLVESTRO A., ESCARGUEL C., CASALTA J.P., DEWILDE A.**
La sérologie des infections à *Mycoplasma pneumoniae*.
Spectra Biol., 1990, 90 : 63-67.
- 87 - **PATEY L.**
Enquête étiologique sur les pneumopathies aiguës acquises en ville.
Rev. Prat., 1990, 81 : 5-6.
- 88 - **PEROL Y., LATRILLE J.**
Diagnostic biologique des infections humaines à mycoplasmes.
Med. Mal. Infect., 1975, 5 : 265-276.
- 89 - **PIEMONT Y., PREVOST G., MONTEIL H.**
Sondes d'acides nucléiques et diagnostic bactériologique.
Med. Mal. Infect., 1990, 20 : 182-190.
- 90 - **PRICE P.C.**
Direct radioimmunoassay for the detection of IgM antibodies against *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Immunol. Meth., 1980, 32 : 261-273.
- 91 - **QUENTIN C., CANTET P., RENAUDIN H., BEBEAR C.**
Sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes pathogènes pour l'homme.
Path. Biol., 1985, 33 : 205-212.
- 92 - **RAZIN S., HYMAN H.C., NUR I., YOGEV D.**
DNA probes for detection and identification of mycoplasmas (mollicutes).
Israel J. Med. Sci., 1987, 23 : 735-741.
- 93 - **ROBICHEZ P.**
Les mycoplasmes : techniques de culture et de détection.
Thèse de Médecine, Bordeaux, 1986.
- 94 - **ROSENAU A.**
Les sondes nucléiques en microbiologie appliquée.
Lettre Infect., 1988, 14 : 519-523.
- 95 - **ROULLAND-DUSSOIX D.**
Détection des mycoplasmes grâce à des sondes froides.
Ass. Anc. El. Inst. Pasteur, 1990, 32 : 31.
- 96 - **ROUSSEAU S.A., TETTMAR R.E.**
The serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection : a comparison of complement fixation, haemagglutination and immunofluorescence.
J. Hyg. Camb., 1985, 95 : 345-352.
- 97 - **SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R.**
DNA sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 5463-5467.

- 98 - **SASAKI T., BONISSOL C., STOILJKOVIC B.**
Cross-reactive antibodies to mycoplasma found in human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Microbiol. Immunol., 1987, 31 : 521-530.
- 99 - **SASAKI Y., SHINTANI M., WATANABE H., SASAKI T.**
Mycoplasma genitalium and *Mycoplasma pneumoniae* share a 67 kilo dalton protein as a main cross-reactive antigen.
Microbiol. Immunol., 1989, 33 : 1059-1063.
- 100- **SILLIS M.**
The limitations of IgM assays in the serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections.
J. Med. Microbiol., 1990, 33 : 253-258.
- 101- **SONDERGARD-ANDERSEN J., JENSEN J.S., ULDUM S.A., LIND K.**
Heat-shock protein in *Mycoplasma pneumoniae* shown by immunoblotting to be related to the bacterial common antigen.
J. Inf. Diseases, 1990, 161 : 1039-1040.
- 102- **STEARE S.E., WISELKA M.J., KURINCZUK J.J., NICHOLSON K.G.**
Mycoplasma pneumoniae infection associated with Henock-Schonlein purpura.
J. Infect., 1988, 16 : 305-306.
- 103- **STEINMETZ G., LE FAOU A., REIS J., GUT J.P., COLLARD M.**
Manifestations neurologiques graves associées à un épisode infectieux aigu des voies aériennes : rôle de *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Med. Strasbourg, 1985, 16 : 119-121.
- 104- **TEXIER J., CANTET P., BEBEAR C., LATRILLE J.**
Infections respiratoires à *Mycoplasma pneumoniae* de l'adulte. A propos de quatre observations.
Med. mal. Infect., 1980, 10 : 399-402.
- 105- **TSUNEKAWA H., TAKAGI E., KISHIMOTO H., SHIMOKATA K.**
Depressed cellular immunity in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia.
Eur. J. Resp. Dis., 1987, 70 : 293-299.
- 106- **TUAZON C.U., MURRAY H.W.,**
Atypical pneumonia.
In "Respiratory Infections" JE Pennington, Raven Press Ed, New York, 1988:341-343.
- 107- **TULLY J.G.**
New laboratory techniques for isolation of *Mycoplasma pneumoniae*.
Yale J. Biol. Med., 1983, 56 : 511-515.
- 108- **ULDUM S.A., SONDERGARD-ANDERSEN J., SKOV-JENSEN J., LIND K.**
Evaluation of a commercial enzyme immuno-assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* specific immunoglobulin G antibodies.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1990, 9 : 221-223.

- 109- **WASHINGTON J.A.**
Non invasive diagnostic techniques for lower respiratory infections.
In "Respiratory Infections", Raven Press Ed, New York,
1988:52-68.
- 110- **WENZEL R., HERRMANN R.**
Physical mapping of the Mycoplasma pneumoniae genome.
Nucleic Acids Res., 1988, 16 : 8323-8336.
- 111- **WENZEL R., HERRMANN R.**
Repetitive DNA sequences in Mycoplasma pneumoniae.
Nucleic Acids Res., 1988, 16 : 8337-8350.
- 112- **WENZEL R., HERMANN R.**
Cloning of the complete Mycoplasma pneumoniae genome.
Nucleic Acids Res., 1989, 17 : 7029-7043.
- 113- **WICHER K., WICHER V.**
Mycoplasmal infections.
In "Microbial antigenodiagnosis", CRC Press Ed, USA, 1983, 2 : 93-94.
- 114- **WILLIAM H., KRAYBILL W.H., CRAWFORD Y.E.**
Tetrazolium and methylene blue for isolation and recognition of
Mycoplasma pneumoniae.
Bact. Proc., 1964:70
- 115- **WOODHEAD M.A.**
Pneumopathies communautaires.
Congrès International sur les Maladies Infectieuses, Montréal, 1990,
Vol 1, Abstract 13.
- 116- **YAYOSHI M., HAYATSU E., YOSHIOKA M.**
Protective effects of Mycoplasma pneumoniae live vaccine or its
hyperimmune serum on the experimental infection in mice.
Kansenshogaku zasshi, 1989, 63 : 684-691.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	16
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	18
I - HISTORIQUE	19
11 - Mycoplasmes	19
12 - Mycoplasma pneumoniae	21
II - CLASSIFICATION	23
III - PROPRIETES	29
31- Propriétés communes aux mycoplasmes	29
311- Structure	29
312- Génôme	33
313- Constitution antigénique	36
314- Culture et croissance	36
32- Propriétés spécifiques de mycoplasma pneumoniae	42
321- Structure	42
322- Génôme	43
323- Constitution antigénique	47
324- Culture et croissance	50
IV - POUVOIR PATHOGENE DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE	53
41- Epidémiologie	53
42- Transmission	54
43- Immunité	58
44- Pathogénicité	61

441- Action directe du micro-organisme	61
442- Action indirecte par le biais du système immunitaire	64
443- Mycoplasme co-facteur du VIH ?	66
45 - Manifestations cliniques	66
451- Manifestations respiratoires	66
451-1- Clinique	67
451-2- Image radiologique	68
451-3- Anatomopathologie	69
451-4- Evolution	71
451-5- Complications	71
452- Manifestations extra-pulmonaires	77
453- Conclusion	77
V - BASES DU TRAITEMENT	78
51- Traitement curatif	78
511- Antibiotiques	78
512- Indications	79
513- Efficacité et surveillance du traitement	79
52- Prévention	80
DEUXIEME PARTIE : METHODES DE DIAGNOSTIC	82
I - ANOMALIES BIOLOGIQUES NON SPECIFIQUES	84
11- Sériques	84
111- Leucocytes	84
112- VS et CRP	84

113- Anticorps irréguliers	84
113-1- Agglutinines froides	84
113-2- Anticorps anti-streptocoque MG	85
113-3- Anticorps anti-noyaux	85
113-4- Anticorps anti-glycolipides	85
113-5- Test de Coombs direct	86
12- Fonction hépatique	86
13- Fonction rénale	86
14- Liquide céphalo-rachidien	86
15- Oropharynx	87
II - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DIRECT	88
21- Prélèvements	88
211- Tractus respiratoire	88
212- Liquides biologiques	90
213- Tissus	90
22- Transport et conservation des prélèvements	91
23- Examen direct	91
24- Diagnostic rapide : mise en évidence des antigènes	92
241- Immunofluorescence directe (IFD)	92
242- Contre immunoélectrophorèse (CIE)	93
243- ELISA	93
244- Immunoblot	94
245- Dot-blot	95
246- Hybridation moléculaire et amplification génique	97
246-1- Principe de l'hybridation moléculaire	97

246-2- Moyens	99
246-21- Sondes d'acides nucléiques	99
246-22- Marqueurs	100
246-23- Supports physiques et conditions d'hybridation	104
246-3- Applications et résultats	106
246-4- Amplification génique	108
246-41- Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR	108
246-42- QB amplification	111
25- Culture cellulaire	111
26- Culture sur milieux synthétiques	114
261- Milieux de culture	114
262- Ensemencement et surveillance des cultures	118
263- Identification	120
III - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE INDIRECT OU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE	125
31- Immunofluorescence indirecte (IFI)	126
32- Réaction de fixation du complément (RFC)	127
33- Hémagglutination indirecte (HAI)	128
34- Réactions d'inhibition de croissance et d'inhibition métabolique	130
341- Réaction d'inhibition de croissance	130
342- Réactions d'inhibition métabolique	131
35- Dosage ELISA	133

36- Test d'inhibition de l'adhésion de Mycoplasma pneumoniae a des globules rouges de mouton en présence d'anticorps spécifiques	135
37- Agglutination de particules sensibilisées	135
38- Contre immunoélectrophorèse	136
39- Immunoblotting	136
310- Dosage radioimmunologique (RIA)	139
IV - DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	140
41- Pneumopathies atypiques primitives	140
42- Mycoplasmes autres que Mycoplasma pneumoniae	141
TROISIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE PROSPECTIVE	142
I - MATERIEL ET METHODES	144
11- Patients	144
12- Matériel	155
121- Milieu de culture expérimental testé lors de ce travail (BIO MERIEUX)	155
122- Autres milieux de culture utilisés	155
122-1- Mycoplasma kit (BIO MERIEUX)	155
122-2- Gélose au sang (BIO MERIEUX)	157
13- Méthodes	157
131- Prélèvements et conditions de transport	157
132- Ensemencement et incubation des milieux de culture	158

132-1- Milieu de culture expérimental (MCE)	158
132-11- Ensemencement	158
132-12- Incubation	163
132-2- Autres milieux	163
132-21- Mycoplasma kit (MK)	163
132-22- Gélose au sang (GS)	164
133- Surveillance et méthodes d'identification	164
133-1- Les milieux de culture sont observés toutes les 48 heures	164
133-2- En cas de culture positive sur milieu de culture expérimental	165
133-3- En cas de contamination du milieu de culture expérimental	166
134- Tests sérologiques	167
134-1- Réaction de fixation du complément	167
134-2- Agglutinines froides	167
135- Autres tests pratiqués	167
135-1- Diagnostic direct	168
135-11- Examen direct et culture des prélèvements	168
135-12- Antigènes solubles	168
135-2- Diagnostic sérologique	168
135-21- Diagnostic sérologique bactérien	168
135-22- Diagnostic sérologique viral	169
135-23- Diagnostic sérologique aspergillaire	169
135-24- Diagnostic sérologique toxoplasmique	169

II- RESULTATS	170
21- Résultats cliniques	170
22- Résultats biologiques	181
221- Prélèvements	181
222- Cultures	181
222-1- Mycoplasma pneumoniae	184
222-2- Autres micro-organismes	184
223- Réaction de fixation du complément	185
224- Agglutinines froides	187
23- Autres tests biologiques effectués	189
231- Diagnostic direct	189
232- Diagnostic indirect	190
232-1- Diagnostic sérologique bactérien	190
232-2- Diagnostic sérologique viral	190
24- Conclusion	190
III- DISCUSSION	191
31- Patients	191
32- Avantages et inconvénients des différentes modalités de prélèvements	193
33- Intérêt du milieu de culture expérimental	194
34- Intérêt des autres tests effectués	196
341- Tests spécifiques de Mycoplasma pneumoniae	196
341-1- Réaction de fixation du complément	196
341-2- Agglutinines froides	198
342- Tests non spécifiques de Mycoplasma pneumoniae	199

CONCLUSION ET PERSPECTIVE	200
BIBLIOGRAPHIE	203
TABLE DES MATIERES	215

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 30

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Bien que *Mycoplasma pneumoniae* soit une des principales causes de pneumopathie aiguë primitive (10 à 30 %), son diagnostic biologique est rarement porté car sa pathogénicité, variée, est le plus souvent bénigne.

Les progrès récents de la biologie moléculaire et la connaissance plus précise du micro-organisme ont permis de faire progresser les tests biologiques : amélioration des milieux de culture, développement des sondes moléculaires et de l'amplification génique (PCR), utilisation d'antigènes spécifiques, immunogènes et purifiés et d'anticorps homologues.

Au cours d'une étude prospective portant sur 25 patients vus en milieu hospitalier, présentant une pneumopathie, deux infections à *Mycoplasma pneumoniae* ont été diagnostiquées grâce à la culture, la réaction de fixation du complément et la recherche d'agglutinines froides. Cependant, l'utilisation en routine de ces tests biologiques n'est pas assez fiable pour répondre aux besoins des cliniciens. Aussi est-il souhaitable de continuer à développer et à évaluer des tests plus performants.

MOTS CLES :

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

INFECTIONS RESPIRATOIRES