

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Option: sciences de la vie et de la santé

par

Marie-Florence LIEPMANN

**MISE AU POINT DE TESTS IMMUNOENZYMATIQUES
POUR LA DETECTION D'ANTIGENES
ET D'ANTICORPS SPECIFIQUES DES INFECTIONS
A MYCOPLASMES URO-GENITAUX**

Soutenu le 8 décembre 1989, devant la commission d'examen

le Professeur G.SPIK
le Professeur P. WATTRE
le Professeur J.C. DERIEUX
le Professeur A. TARTAR



A Pascal,

A mes parents avec toute mon affection,

*Au Docteur Roger LIEPMANN, pour son soutien constant,
A Marie-Noëlle,
A tous ceux qui me sont chers.*

A Monsieur le Professeur P. WATTRE,

*qui m'a chaleureusement acceptée au sein de son service de
bactériologie-virologie B du C.H.U. et de l'Institut Pasteur de Lille.*

*Vous êtes à l'origine de ce sujet et vous m'avez conseillée tout au long
de cette étude.*

*L'intérêt que vous lui avez toujours manifesté m'a été d'un grand
réconfort.*

*Soyez assuré de toute ma gratitude et veuillez trouver, dans cet ouvrage,
l'expression de mon plus profond respect.*

A Mademoiselle le Professeur G. SPIK,

Durant mon cursus universitaire, j'ai souvent pu apprécier votre grand savoir scientifique ainsi que la qualité de vos cours.

Vous me faites le grand honneur de présider cette thèse, je vous en remercie grandement.

A Monsieur le Professeur J. C. DERIEUX

J'ai été très touchée de l'intérêt qu'il vous a plu de réserver à ce travail

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail.

A Monsieur le Professeur A. TARTAR,

J'ai été très touchée de l'intérêt qu'il vous a plu de réserver à ce travail.

Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères.

*A Monsieur DE DECKER, directeur du Service de Biologie
Spécialisée de l'Institut Pasteur de Lille,*

*Vous m'avez accueillie dans votre service et j'ai été très touchée
de l'intérêt qu'il vous a plu de réserver à mes travaux.*

*Je vous prie de bien vouloir trouver dans ce travail
l'expression de ma gratitude la plus sincère.*

*A Monsieur DELAGNEAU, de Diagnostic Pasteur, qui m'a permis,
grâce à l'établissement d'un contrat, de mener à bien
matériellement ces deux années de thèse.*

Je remercie tout particulièrement, pour le travail qu'ils ont accompli et l'aide qu'ils m'ont apportée :

- *Monsieur A. HAQUE, Ph.D., directeur du laboratoire de recherche sur l'H.I.V., qui m'a conseillée dans les techniques d'immunisation de souris.*

- *Monsieur B. SLIZEWICZ, de Diagnostic Pasteur, pour sa collaboration attentionnée.*

- *Madame J. DELETREZ, qui m'a secondée tout au long de ce travail, dont j'ai souvent pu apprécier l'efficacité, la disponibilité et la bonne humeur en toutes circonstances.*

- *Monsieur P. HAW, pour ses compétences en chromatographie.*

- *Madame BROCHARD, responsable du Service de documentations de l'Institut Pasteur de Lille, qui a toujours répondu favorablement à mes demandes de publications.*

- *Madame C. MAKIVIC, qui a assuré avec diligence la dactylographie de ce travail.*

RESUME

Etant donné la latence et la chronicité de l'infection par les mycoplasmes uro-génitaux, *M. hominis* et *U. urealyticum*, leur évolution à bas bruit vers de lourdes séquelles, il nous a semblé nécessaire de disposer de techniques simples et reproductibles permettant un diagnostic rapide des infections par ces microorganismes. Pour pallier à la lourdeur et la difficulté de la culture, nous avons mis au point une méthode rapide d'identification des mycoplasmes à partir de produits pathologiques. Mais étant donné la fréquence des porteurs sains de mycoplasmes, l'identification du germe ne peut suffire à établir une relation de cause à effet entre le mycoplasme et le syndrome observé. Il est nécessaire de prouver son rôle antigénique en démontrant l'élaboration d'anticorps humoraux spécifiques. Dans cet objectif, nous avons développé un test immunologique pour la recherche d'anticorps.

Le test immunologique choisi est un Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Pour son élaboration, des membranes de *M. hominis* et d'*U. urealyticum* ont été obtenues après une lyse aux ultrasons suivie d'une centrifugation différentielle. Après avoir étudié plusieurs types de détergents, les antigènes membranaires sont solubilisés par du déoxycholate de sodium et leur antigénicité vérifiée. D'autre part, les protéines 102 et 116 kD spécifiques de *M. hominis* sont obtenues par élution électrophorétique; cet antigène est comparé à l'antigène membranaire soluble précédent. Les conditions optimales du test ELISA sont étudiées à l'aide d'un immunosérum de lapin anti *M. hominis* et/ou *U. urealyticum*. La méthodologie est appliquée au diagnostic chez 150 patients.

En ce qui concerne le test direct, l'Immunobinding Assay (IBA), des anticorps spécifiques des espèces étudiées sont préparés par immunisation des souris. Des immunoglobulines sont purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium des immunosérums de souris suivie d'une dialyse de trois jours et d'une chromatographie d'échangeurs d'ions. La spécificité du test est étudiée vis-à-vis de 5 mycoplasma et 8 ureaplasma. La technique est appliquée à l'étude de 20 prélèvements génitaux humains.

Ce travail a fait l'objet des communications et publications suivantes:

COMMUNICATION:

LIEPMANN M.F., A.Dewilde, P.Wattré, C.Hacot et A.Daunizeau.

Détection d'anticorps anti-*Ureaplasma urealyticum* par une méthode ELISA.

2ème congrès mondial sur les maladies sexuellement transmissibles (MST). Paris, juin 1986.

PUBLICATIONS:

LIEPMANN M.F., A.Daunizeau et P.Wattré.

Detection d'anticorps anti-*Ureaplasma urealyticum* et anti-*Mycoplasma hominis* par une méthode ELISA.

Nouv. Dermatol., 1988, 7, 240-241

LIEPMANN M.F., P.Wattré, A.Dewilde, G.Papierok and M.Delecour.

Detection of antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using membrane antigen and investigation of the significance of the antibodies.

J.Clin.Microbiol., 1988, 26, 2157-2160.

LIEPMANN M.F., P.Gireaudot, J.Deletrez, L. de Decker and P.Wattré.

Use of the *Mycoplasma hominis* 102-116 kD proteins as antigen in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Microbios., 1989, sous presse.

INTRODUCTION GENERALE

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivant à l'état libre que l'on puisse cultiver en milieu artificiel. Plus petits que certains virus, ils sont néanmoins doués de possibilité de synthèses et de vie autonome, ce qui fait que pendant longtemps, ils ont occupé une place mal définie chez les procaryotes. Individualisés maintenant dans une classe particulière : les Mollicutes, ils se distinguent respectivement des virus et des bactéries par des caractères fondamentaux.

Leur rôle pathogène, bien démontré depuis près d'un siècle chez les animaux, a été récemment découvert chez les végétaux et les insectes. En ce qui concerne l'homme, un seul mycoplasme : *Mycoplasma pneumoniae* possède un pouvoir pathogène indiscutable; d'autres Mollicutes, notamment *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* saprophytes de l'homme peuvent intervenir dans des processus pathologiques de façon plus ou moins directe. Actuellement, leur rôle pathogène est reconnu dans 15 % des cas d'urétrites non gonococques pour *Ureaplasma urealyticum* et dans les salpingites et fièvres post-partum pour *Mycoplasma hominis*. Leur implication dans la stérilité ou les infections néo-natales est encore discutée.

I. HISTORIQUE

Des microorganismes responsables de péripneumonies bovines furent isolés pour la première fois en 1898 par Nocard et Roux. Nowarck proposa en 1929 l'appellation de Mycoplasmes en accord avec l'aspect pseudo mycélien et le pléiomorphisme de ces organismes (20).

Les mycoplasmes furent seulement l'objet d'études descriptives avant leurs premiers isoléments et observations en 1937 chez l'homme par Dienes et Edsall (17) à partir de pus de Bartholinite. En effet, ce groupe d'organismes était communément isolé d'espèces animales, les premiers groupes de mycoplasma ayant été identifiés comme l'agent étiologique de la pleuropneumonie bovine.

En 1954 (63), Shepard mit en évidence dans les sécrétions uréthrales de sujets atteints d'urétrites non gonococciques des mycoplasmes qu'il nomma souche T (de "Tiny"), en raison de la très petite taille des colonies constituées par ces microorganismes. En 1961, Chanock, Hayflick et Barile (15) montrèrent que l'affection humaine appelée "pneumonie atypique primitive", attribuée à tort à un virus appelé "agent d' Eaton", était provoquée par un mycoplasme : *Mycoplasma pneumoniae*.

Avec l'établissement de l'implication directe des mycoplasmes dans des infections humaines, débute une aire nouvelle en mycoplasmologie. Ainsi des efforts de recherches considérables sont effectués sur les mycoplasmes associés aux voies génitales humaines ainsi qu'à l'oropharynx.

II. CLASSIFICATION

Le groupe des mycoplasmes humains génitaux et oraux a été différencié initialement à partir de propriétés microbiologiques, biochimiques et sérologiques par Nicol et Edward en 1953 (46).

Un classement similaire basé sur les caractéristiques de culture et biochimiques a été proposé indépendamment et simultanément par Freund en 1955 (19).

Les mycoplasmes font parties de la classe des Mollicutes et de l'ordre des Mycoplasmatales.

L'ordre se divise en trois familles :

A. MYCOPLASMATACEAE

1) Genre *Mycoplasma* : (10 espèces humaines)

- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma fermentans*
- *Mycoplasma genitalium*
- *Mycoplasma orale*
- *Mycoplasma buccale*
- *Mycoplasma salivarium*
- *Mycoplasma faucium*
- *Mycoplasma lipophilium*
- *Mycoplasma primatum*

2) Genre *Ureaplasma* : (1 seule espèce)

- *Ureaplasma urealyticum*

B. ACHOLEPLASMATACEAE

Un seul genre : Genre *Acholeplasma* (7 espèces)

C. SPIROPLASMATACEAE

III. CARACTERES GENERAUX

A/ Morphologie

Procaryotes, les mycoplasmes sont les plus petits microorganismes capables d'une multiplication autonome en milieu acellulaire. Ils présentent un pléiomorphisme très important, dû à l'absence de paroi. La morphologie des mycoplasmes peut aussi varier avec la composition du milieu et avec la phase de croissance dans laquelle ils se trouvent. Les formes observées comprennent des cocoïdes, des formes spiralées ainsi que des formes bourgeonnantes ou filamenteuses. Leur taille se situant entre 80-100 nm et 400-100 nm pour les plus grands (56).

B/ Mode de reproduction

La division n'est pas très différente de celle des autres procaryotes. On peut observer une division binaire donnant naissance à deux cellules filles de même taille ou un bourgeonnement, les deux cellules filles étant alors de taille inégale. La division cytoplasmique étant souvent en retard sur la replication du génome, on peut observer l'apparition de filaments qui se fragmentent ultérieurement.

C/ Ultrastructure

Des sections fines de mycoplasmes révèlent en microscopie électronique, une structure assez simple aux caractères suivants (figure 1) :

- une membrane plasmique : constituée d'un triple feuillet de 60 à 75 Å, formé de deux couches externes opaques aux électrons et d'une couche interne moins dense.
- un cytoplasme : constitué d'une substance finement granulaire. Il contient une molécule d'acide déoxyribonucléique (ADN) bicatenaire qui constitue le génome ainsi que de nombreux ribosomes mais ne présente pas de mitochondries.

1. La membrane plasmique

Les mycoplasmes génitaux, comme tous les mycoplasmes, sont dépendants de leur hôte, aussi l'architecture de la membrane a une grande importance pour leur attachement sur les surfaces muco-sales de celui-ci et dans la réponse immune vis-à-vis du parasite.



Figure 1 : Suspension cellulaire de mycoplasmes observée en microscopie électronique (grossissement 70 000)

La composition chimique de la membrane est de l'ordre de 57 % de protéines, 41 % de lipides et 0,8 % de sucres (57). Cependant, le rapport lipides- protéines varie avec l'âge des cellules. La densité de la membrane augmente de 1,15 g/cm³ durant la phase exponentielle à 1,19 g/cm³ durant la phase de déclin de croissance (60).

a) Les lipides membranaires

Les lipides membranaires consistent en 60 % de lipides neutres et 40 % de lipides polaires. Parmi les lipides neutres, on distingue: 19 % d'esters de cholestérol, 23 % de triglycérides, 10 % d'acides gras et des traces de diglycérides et monoglycérides. Les lipides polaires sont synthétisés à partir d'acides gras présents dans le milieu. Les chaînes acyl des lipides polaires sont plus saturées que celles des fractions neutres. Le phosphatidylglycérol est le lipide polaire dominant, le lysophosphatidylglycérol et l'acide phosphatidique étant des composants mineurs. Aucun glycolipide n'a été détecté.

Le rapport cholestérol/lipide polaire est constant durant le cycle de croissance, mais la composition en lipides polaires change : durant la phase logarithmique de croissance (58), la biosynthèse des lipides décline et il y a accumulation d'acide phosphatidique (60).

b) Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont divisées en 2 groupes : les protéines périphériques, facilement détachables par des traitements doux (changement de pH, traitement ionique) et des protéines internes hydrophobes détachables seulement par des traitements avec détergents ou solvants organiques. Seulement 8 à 14 % des protéines membranaires sont de types périphériques (53).

L'analyse en gel de polyacrylamide -SDS (PAGE-SDS) a permis de détecter plus de 20 polypeptides de poids moléculaires allant de 30 000 à 200 000 d (2, 25).

c) Disposition des protéines et lipides

L'iodination et l'action de protéases sur des cellules intactes et des membranes révèlent une disposition asymétrique des protéines dans la membrane avec plus de protéines sur la face interne qu'externe (25), les protéines de hauts poids moléculaires étant situées sur la face externe (25). La variation des protéines de haut poids moléculaire chez différentes souches entraîne une hétérogénéité sérologique. Des lectines marquées radioactivement se lient uniquement du côté externe de la membrane (28). Ces essais indiquent la présence à la surface cellulaire de carbohydrates, glycoprotéines, polysaccharides ou lipopolysaccharides. Ces substances ont probablement leur importance dans l'interaction entre le mycoplasme et les cellules eucaryotes. Une affinité de la membrane de *M. hominis* avec des lectines à spécificité lactose et mannose a été observée (8). Peu de choses sont connues sur la distribution des lipides dans la membrane des mycoplasmes. On a pu démontrer une asymétrie membranaire avec un respect de l'état physique des lipides. L'analyse en résonance para électronique (RPE) révèle un haut degré de liberté et de mouvement des spin des acides gras, ceci étant plus marqué sur la face externe qu'interne de la membrane. Ce fait reflète l'asymétrie de la distribution des protéines qui, probablement, affecte la mobilité des lipides (59).

d) Filaments contractils

M. hominis et *U. urealyticum* ne sont pas mobiles, à l'inverse des mycoplasmes avec structures spécialisées (9). Aucune protéine de type actine n'a été retrouvée (54).

2. Le cytoplasme

Le cytoplasme, chez les mycoplasmes, a une apparence bien uniforme et contient des ribosomes ainsi que du matériel nucléaire. De fines sections peuvent révéler des variations dans la densité du matériel nucléaire et dans la distribution des ribosomes ; ces différences sont dépendantes des conditions de croissance, de l'âge, de la viabilité des cellules et des méthodes utilisées dans la préparation du matériel pour la microscopie électronique (4, 55).

a) Les ribosomes

Les ribosomes des mycoplasmes ont une taille maximale de 17,5 nm (4). Ils sont constitués de 61 % d'acide ribonucléique (ARN) et de 39 % de protéines (27). La constante de sédimentation des ribosomes intacts est de 71S, et le ribosome peut être dissocié en 2 sous-unités (33S et 53S) à concentration faible en Mg^{2+} . En gradient de sucrose, les sous-unités sédimentent parallèlement à celles de *E. Coli*, mais leur dissociation nécessite une plus forte concentration en Mg^{2+} que chez *E. Coli*.

L'ARN ribosomal possède des constantes de sédimentation de 22S, 16S et 5S. Tous les ARN ribosomiaux (ARN r) ont un pourcentage inférieur en guanine plus cytosine (G+C%) aux molécules correspondantes chez *E. Coli*. La sous-unité 5S diffère le plus avec un contenu G + C % de 43,1 contre 63,7 chez *E. Coli*. Des électrophorèses sur PAGE-SDS révèlent 21 protéines associées à la sous-unité 53S et 18 bandes associées à la sous-unité 33S (27).

Les ARN de transfert (ARN t) des mycoplasmes sont de la même taille que ceux de *E. Coli*, cependant le nombre de bases modifiées est sensiblement inférieur chez les mycoplasmes que chez *E. Coli* (27).

b) Le génome

L'ADN des mycoplasmes a un poids moléculaire de $4,5 \cdot 10^8$ (6). La capacité de codage, en terme de nombre de gènes, est inférieure chez les mycoplasmes par rapport aux autres bactéries chez lesquelles le poids moléculaire de l'ADN est le plus élevé.

Ces différences se reflètent dans la capacité limitée de biosynthèse polypeptidique des mycoplasmes et dans leur exigence nutritionnelle.

Le contenu G + C % du génome est de 27,3 - 29,3 (45).

Des test d'hybridation ADN-ADN ont montré qu'il existe une certaine hétérogénéité génomique entre les souches (69).

IV CARACTERES CULTURAUX ET METABOLIQUES

A/ Composition des milieux

Les facteurs de croissance étant variables d'une espèce à l'autre, les seules difficultés rencontrées résident dans la préparation des milieux. Les milieux de culture contiennent au moins les trois éléments suivants :

- un milieu de base constitué par un extrait de viande et/ou une peptone
- un extrait ou un autolysat de levure de bière destiné a apporter les facteurs de croissance (vitamine du groupe B) et des précurseurs de synthèse des acides nucléiques (pyrimidines-purines)
- un sérum animal à des taux de 10 à 30 %, généralement de cheval ou de poulain. Il ne doit pas contenir d'anticorps vis-à-vis des mycoplasmes à cultiver. Le sérum apporte des éléments indispensables : lipides, phospholipides, acides gras, et surtout cholestérol. Le cholestérol est incorporé dans la membrane des mycoplasmes et leur confère sa rigidité vis-à-vis de l'environnement.

A ces trois constituants, on peut ajouter :

- un système tampon (phosphate)
- des inhibiteurs bactériens : pénicilline, ampicilline, colimycine ou acétate de thallium. Il est à noter que certains mycoplasmes, notamment *U. urealyticum* et *M. genitalium* sont sensibles à l'acétate de thallium
- un indicateur de pH qui met en évidence la croissance bactérienne, accompagnée d'une fermentation du glucose (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*) ou d'une hydrolyse de l'arginine (*M. hominis*) ou de l'urée (*U. urealyticum*).

B/ Facteurs influençant la croissance

Les mycoplasmes peuvent se multiplier en dehors d'une cellule vivante, mais ils possèdent des capacités de biosynthèses limitées et sont très exigeants en ce qui concerne leurs précurseurs.

La plupart des mycoplasmes sont des anaérobies facultatifs. Seuls *M. pneumoniae* et *M. hominis* se développent bien en anaérobiose. Tous les mycoplasmes ont une croissance stimulée par une concentration en gaz carbonique allant de 5 à 10 %. L'atmosphère doit toujours être humide. La température optimale de croissance varie entre 35° et 37°C pour les mycoplasmes humains. Il faut attendre en général 48 à 72 heures pour avoir un maximum de microorganismes, mais l'optimum de croissance est variable selon les espèces : 16 à 20 heures pour *Ureaplasma*, 24 à 48 heures pour *M. hominis*, 7 jours au moins pour *M. pneumoniae* et *M. fermentans*, 3 semaines au moins pour *M. genitalium*.

Le pH du milieu est variable : pH 6 pour *U. Urealyticum* ; 7,2 à 7,4 pour *M. hominis* ; 7,8 pour *M. pneumoniae*. Lors de l'isolement en milieu liquide des mycoplasmes, il ne se produit pas ou peu de trouble, appréciable seulement par comparaison avec un témoin. Un trouble important traduit une contamination par une autre espèce bactérienne.

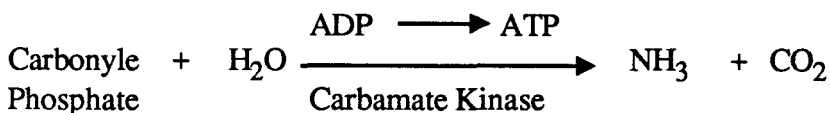
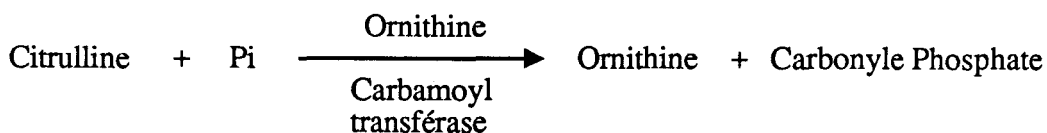
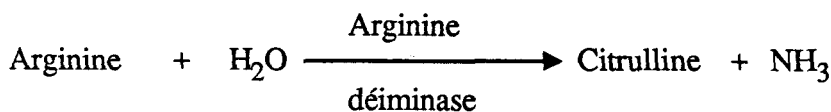
C/ Propriétés biochimiques

1) *Mycoplasma hominis*

Parmi les différentes espèces du genre *Mycoplasma* existent :

- les mycoplasma fermentant le glucose : *M. genitalium*, *M. pneumoniae*
- les mycoplasma hydrolysant l'arginine : *M. hominis*
- les mycoplasma utilisant ces deux métabolites : *M. fermentans*

Les espèces non-fermentaires comme *M. hominis* hydrolysent l'arginine à l'aide de 3 enzymes : ceci constituant la voie dihydrolase (80).



L'arginine déiminase semble être inductible chez *M. hominis* (18), puisque l'activité spécifique décline avec la concentration en arginine dans le milieu de croissance.

Il existe deux possibilités pour détecter la présence de *M. hominis* :

- 1) Mesurer le relargage d'ammoniac : produit de l'hydrolyse de l'arginine. Un indicateur de pH (rouge de phénol) est ajouté au milieu de culture et montre un changement de coloration du jaune-orangé au rouge dans les cultures de mycoplasmes arginine-positive.

2) Mesurer l'activité de l'arginine déiminase : L'activité de l'arginine déiminase est détectée par la formation de citrulline à partir d'arginine à pH 6,5. La formation de citrulline est mesurée par colorimétrie par la méthode d'Archibald modifiée par Ratner (5, 51).

2) *Ureaplasma urealyticum*

L'activité uréase est la seule et plus importante propriété distinguant les *Ureaplasma* des autres organismes de la classe des Mollicutes (65).

L'activité uréasique consistant en une hydrolyse de l'urée en CO₂ et ammoniac, le test pour détecter cette activité réside en l'observation de l'alcalinisation du milieu de culture contenant 1 % d'urée. Mais cette simple technique ne suffit pas, en effet, les mycoplasmes hydrolysant l'arginine et qui ne possèdent pas d'activité uréase, causeraient une alcalinisation du milieu de croissance. Des tests spécifiques sont donc recommandés.

Une méthode développée par Shepard et Howard (64) est basée sur la formation de dioxyde de manganèse à partir de chlorure de manganèse en présence d'ammoniac libéré durant l'hydrolyse de l'urée.



Le dioxyde de manganèse, insoluble dans l'eau, précipite et donne une couleur brun foncé aux colonies.

V RÔLE DES MYCOPLASMES EN PATHOLOGIE URO-GENITALES

A/ Cause de la pathogénicité

Les mycoplasmes génitaux sont transmis par voie sexuelle. Dépendant de nombreux facteurs incluant l'âge, le nombre de partenaires et l'environnement socio-économique, ils peuvent être isolés à partir de tractus uro-génital chez plus de 55 % des adultes asymptomatiques. La présence de ces 2 espèces à l'état commensal chez les individus sains rend difficile l'appréciation de leur pouvoir pathogène.

Leur affinité pour les membranes cellulaires expliquerait leur pathogénicité (52). Toutefois, la nature des récepteurs à la surface des cellules épithéliales est encore peu étudiée. Grâce à cette association étroite avec l'épithélium, qui pourrait aller jusqu'à la fusion des membranes cytoplasmiques (21), les mycoplasmes se procurent en particulier les précurseurs d'acides nucléiques dont ils ont besoin pour leur croissance. Ils peuvent même épuiser les réserves intracellulaires d'arginine et de glutamine et ainsi altérer le métabolisme et la vie des cellules des muqueuses. Il semble également logique de considérer que l'effet cytopathogène observé puisse être dû à la toxicité des produits élaborés par le métabolisme des mycoplasmes. Ces derniers produisent des enzymes qui pourraient altérer, voire provoquer la lyse des membranes cellulaires. Pour étudier les effets et les facteurs de cette toxicité, la culture d'organes *in vitro*, en particulier de l'épithélium cilié de la cavité utérine, a été utilisée. En effet, l'activité ciliaire reflète la viabilité des tissus. Stalheim et Gallagher (71) ont pu reproduire l'effet toxique d'*Ureaplasma* en ajoutant à ces cultures soit *Ureaplasma*, soit de l'uréase, soit du sulfate d'ammonium, montrant ainsi que l'utilisation de l'activité ciliaire par *Ureaplasma* était due à une production d'ammoniac. Celui-ci pouvait être produit par un autre mécanisme que l'action de l'uréase, tel que l'activité de la L-histidine-ammonia-lyase présente chez *Ureaplasma* (1). Utilisant cette même technique, Taylor-Robinson et Carney (74), puis Mardh *et al* (37) ont inoculé *M. hominis* à l'épithélium cilié de la trompe de Fallope et ont observé la formation d'un gonflement des cils sans arrêt de l'activité ciliaire; les résultats sont confirmés en 1983 par Swenson *et al* (73).

B/ Immunité, Défense de l'organisme contre l'infection

Si l'adhérence des mycoplasmes aux membranes des cellules de la muqueuse favorise l'infection, l'installation fréquente d'un état chronique amène à penser que l'organisme possède des moyens de défense pour limiter l'extension de l'infection. Le mucus pourrait jouer ce rôle. Il est en effet bien connu qu'au niveau de la muqueuse il y a production d'IgA sécrétoires qui peuvent aussi neutraliser l'infection (16).

Lors d'une infection uréthrale ou vaginale, une leucocytose importante est généralement observée. Les polynucléaires peuvent phagocyter et détruire rapidement un grand nombre de mycoplasmes (68), mais quelques uns d'entre eux peuvent survivre à cette phagocytose et perpétuer l'infection. Horne *et al* (26) ont observé, dans des cas d'endométrites associées à une infection par *Ureaplasma*, une réaction inflammatoire telle que les cellules (macrophages et surtout lymphocytes) pouvaient provoquer une obstruction de la trompe de Fallope, cause de stérilité.

C/ Tableaux cliniques

1) *Mycoplasma hominis*

De récentes études basées sur la culture et la sérologie ont suggéré que sous certaines conditions, ce microorganisme opportuniste était capable d'envahir les voies génito-urinaires hautes et d'avoir une signification étiologique dans les pyélonéphrites, salpingites, fièvres du post-partum et dans des infections du liquide amniotique (38). D'autre part, des infections extragénitales par *M. hominis* ont été décrites. Celles-ci incluent des bactérihémies (67, 70), des pneumonies (13, 61), des méningites (22, 39), des arthrites (41), des abcès (47, 49), des péritonites (52) et des infections de blessure (33, 72).

2) *Ureaplasma urealyticum*

Ce microorganisme est responsable d'environ 15 % des cas d'urétrite non gonococcique (75, 76). Il joue peut-être un rôle dans la survenue de stérilités inexplicées et de troubles de la reproduction : avortements spontanés, chorioamniotitis, hypertrophies néonatales, (7, 44, 75).

VI METHODES DE DIAGNOSTIC

A/Diagnostic direct

1) Les prélèvements

Comme les mycoplasmes ont une affinité très grande pour les membranes des cellules des muqueuses, il est important de recueillir le plus grand nombre de cellules possible. Aussi, on procède à un écouvillonnage vaginal, ou à un écouvillonnage et/ou grattage de la muqueuse uréthrale. Les urines sont aussi un bon prélèvement. Il est nécessaire de centrifuger pour récolter les cellules et les filaments muqueux qui peuvent s'y trouver.

Les mycoplasmes sont rarement retrouvés dans les prélèvements sanguins. Cependant, des hémocultures ont été trouvées positives pour *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* en particuliers au cours de fièvres puerpérales.

Il est possible également de recevoir au laboratoire des tissus prélevés par biopsie ou autopsie : par exemple des prélèvements de rein ou de placenta. Il ne faut jamais les homogénéiser. Dans les extraits cellulaires, les enzymes lysosomiaux libérés peuvent altérer l'intégrité des mycoplasmes. Il faut donc couper aux ciseaux les fragments de tissu, puis les diluer dans le milieu de culture. De même, il faut toujours diluer les prélèvements de sperme. Enfin, les prélèvements doivent être fait au moment de la phase aiguë de la maladie, la présence d'IgA locales, ou même d'interféron, peuvent être une cause d'inactivation rapide des mycoplasmes.

2) Milieux pour prélèvement et conservation

Nous utilisons un milieu qui consiste en une solution saline tamponnée à laquelle nous ajoutons du sucrose à concentration de 10 %, du sérum de cheval à la concentration 10 % et de la pénicilline (1000 U/ml). Si les prélèvements doivent être gardés quelques jours, il est préférable de les garder à + 4 °C.

3) Inoculation des prélèvements

Celle-ci s'effectue sur milieux artificiels liquides et gélosés. Il n'existe malheureusement pas un milieu unique, satisfaisant les exigences métaboliques de tous les mycoplasmes. Il est d'ailleurs fréquent d'isoler un mycoplasme au premier passage et de le perdre au deuxième passage.

L'aspect des colonies en gélose est certainement le critère le plus commode à observer dans le diagnostic courant. Il faut rechercher les colonies à l'entour des cellules de muqueuse et en bordures des gouttes de prélèvement déposées. *Mycoplasma hominis*, comme tout le groupe des mycoplasma, donne un aspect des colonies dit "en œuf sur le plat" (figure 2). Ceci est dû au fait qu'au centre de la colonie, les mycoplasmes pénètrent dans la gélose : les formes jeunes restent en surface et forment une auréole semblable au blanc d'œuf autour du jaune. Les colonies d'*Ureaplasma* peuvent être soit individuelles, disséminées à la surface de la gélose ou étalées donnant un aspect de petites colonies (figure 3), soit en amas formés par leur fusion. Plus rarement, *Ureaplasma* croît sous forme de colonies, en donnant un aspect de tâches brunes diffuses.

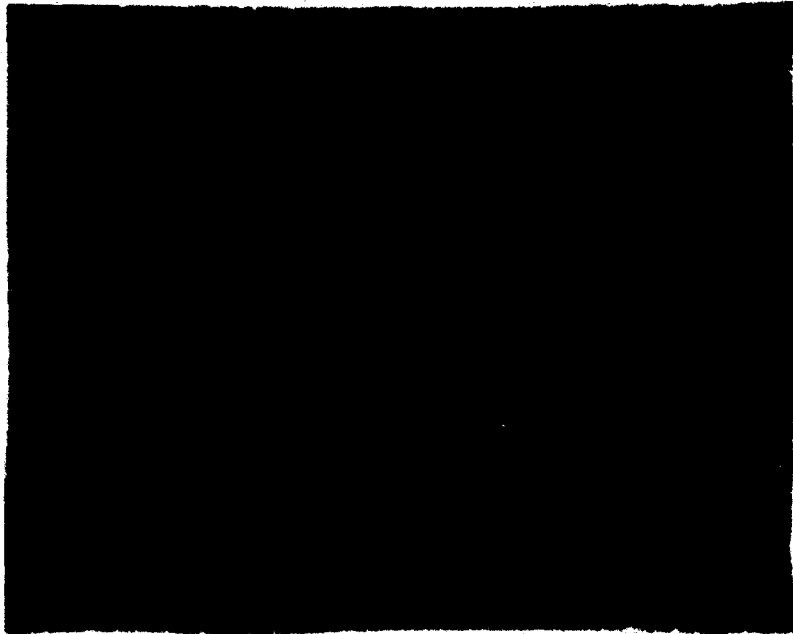


Figure 2 : Colonies de *M. hominis* (grossissement 180)

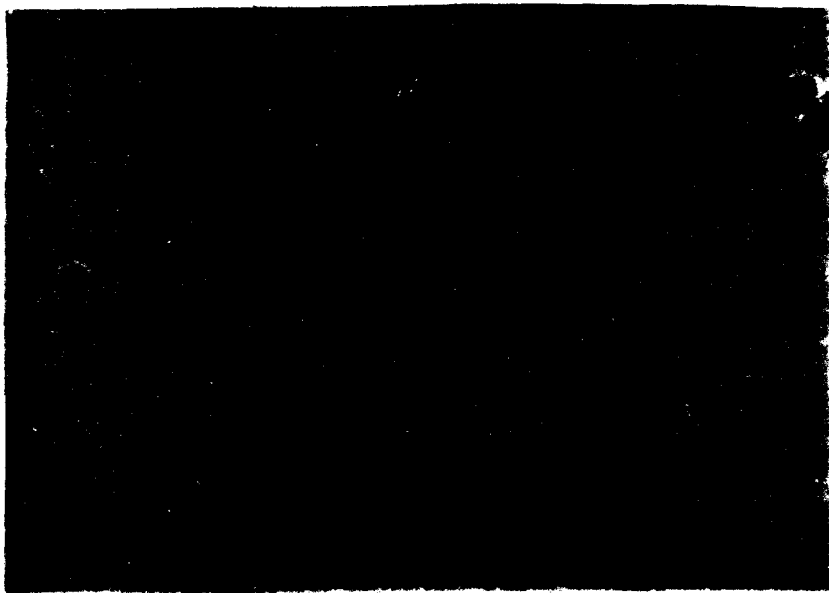


Figure 3 : Colonies *U. urealyticum* (grossissement 180)

4) Problèmes du diagnostic par isolement

Le problème le plus ennuyeux est celui des contaminations bactériennes ou fongiques malgré les antibiotiques ou produits ajoutés aux milieux de culture. Ces contaminations peuvent envahir les cultures avant que les mycoplasmes aient pu se multiplier et donc empêcher le diagnostic ; mais elles n'engendrent pas de faux diagnostics positifs ; sauf dans le cas où l'on aurait affaire à une forme "L" de bactéries. On sait que les formes "L" n'ont pas de paroi et produisent sur gélose des colonies en "œuf sur le plat".

B/ Diagnostic indirect

Des tests utilisant des anticorps spécifiques des antigènes membranaires sont utilisés exclusivement pour séparer les différentes espèces de la classe des Mollicutes et les typer. Ces tests incluent l'inhibition de croissance, l'inhibition métabolique, l'immunofluorescence et le test mycoplasma-cidal (35, 36, 48, 50).

Plus récemment, certains auteurs ont mesuré le taux d'anticorps chez les patients infectés par Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (10, 12, 23, 34, 42, 79).

Mais tous ces tests ne sont que peu ou pas appliqués au Laboratoire d'Analyses Médicales, la culture restant la seule méthode de référence.

MATERIEL ET METHODES

I SOUCHES BACTERIENNES

Toutes les souches proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) :

Souches	Désignation	n° ATCC
<i>Mycoplasma hominis</i>	PG 21	15056
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	type I	27813
	type II	27814
	type III	27815
	type IV	27816
	type V	27817
	type VI	27818
	type VII	27819
	type VIII	27618

II SERUMS

- Groupe I : groupe sain : Il est composé de 50 sérums provenant de femmes donneuses de sang au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille.
- Groupe II : groupe à risque : Sont regroupés 100 sérums provenant de patientes volontaires asymptomatiques, choisies d'après leur bas niveau socio-économique, la pluralité des partenaires présentée ou leurs antécédents gynécologiques. Chacune d'entre-elles, a bénéficié de prélèvements vaginal et sanguin. Les résultats de la culture sont reportés dans le tableau ci-dessous :

Culture M. hominis \ Culture U. urealyticum	Négative	Positive	
		< 10 ⁴ col/ml	≥ 10 ⁴ col/ml
Négative	15	10	20
Positive < 10 ⁴ col/ml	6	0	2
Positive ≥ 10 ⁴ col/ml	9	1	37

III PREPARATION DES ANTIGENES DE *MYCOPLASMA HOMINIS* ET *D'UREAPLASMA UREALYTICUM*

A/ Préparation de membranes cellulaires de *M. hominis* et d'*U. urealyticum*

1) Préparation de suspensions cellulaires

Les milieux de culture utilisés sont :

- le milieu SP-4 de Tully (78) pour *M. hominis* (cf. annexe technique)
- le milieu 10-C de Shepard (66) pour *U. urealyticum* (cf. annexe technique)

Pour chaque souche, une suspension cellulaire est préparée par inoculation de 52 ml d'une culture en croissance logarithmique (10^6 à 10^8 colonies par ml, selon le type de souche), dans 5,6 litres de milieu. Les cultures sont incubées 48 à 72 heures à + 37°C et sont contrôlées quotidiennement. La culture d'un mycoplasme n'entraînant aucun trouble du bouillon, l'apparition d'un trouble important aurait dénoté une contamination bactérienne ou fongique. En cas de doute, un repiquage sur milieu bactériologique sans antibiotiques ou sur milieu de Sabouraud s'impose.

Après un changement de coloration des milieux indiquant une croissance bactérienne, les cellules sont récoltées par centrifugation (Beckman centrifuge J2-21, rotor JA-14) à 26 000 g durant 40 minutes. Les culots sont remis en suspension dans du phosphate buffered saline (PBS) pH 7,3 stérile et lavés quatre fois dans ce même tampon. Avant le dernier lavage, la suspension est soumise durant 30 secondes aux ultrasons (Vibracell, Sonic) afin de dissocier les amas cellulaires. Le culot cellulaire est finalement repris par du tampon NaCl 0,25 M et son contenu en protéines est déterminé selon la méthode de Markwell (40) (cf. annexe technique). Les suspensions cellulaires contiennent en moyenne 4 mg de protéines/ml pour les Ureaplasma et 10 mg pour *M. hominis*.

2) Obtention des membranes cellulaires

Une lyse aux ultrasons est effectuée, à l'intensité maximum de notre sonde, le pourcentage de lyse étant alors fonction du temps. Les conditions optimales de lyse pour *M. hominis* et *U. urealyticum* sont déterminées de la manière suivante : chaque suspension cellulaire est traitée durant 20 minutes, des prélèvements étant effectués toutes les 30 secondes. Afin d'éviter tout échauffement les préparations sont plongées dans un bain de glace. Le degré de lyse est apprécié par la mesure de la densité optique à 500 nm.

Quarante ml de chaque suspension contenant 100 mg de protéines cellulaires sont ainsi lysés 10 minutes par sonication. Les fractions membranaires et cytoplasmiques sont séparées selon le protocole de Hollingdale (24) (figure 4). Les culots membranaires obtenus sont lavés 4 fois par du tampon PBS pH 7,2 stérile et le contenu en protéines est déterminé selon la méthode de Markwell. Afin d'inhiber l'éventuelle action de protéases cellulaires, de l'aprotinine (Sigma) (100 U/ml) est ajoutée à la suspension membranaire.

B/ Préparation d'antigènes membranaires solubles

Différents types de détergents ont été évalués : le dodécyl sulfate de sodium (SDS), le bromure de cetyltriméthyl ammonium (CTAB), le déoxycholate de sodium (DOC), le Nonidet P-40 (NP-40) et le 3 [(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), (Sigma Chemicals). La solubilisation a été étudiée chez *M. hominis* PG21 et *U. urealyticum* type VIII. Chaque suspension membranaire (3,6 mg de protéines par ml) est traitée 15 min. à + 25°C par les différents détergents pour des concentrations comprises entre 1 et 40 mg de détergent par ml. Le degré de solubilisation des membranes est mesuré d'une part par le déclin de la densité optique à 500 nm et d'autre part par le pourcentage de protéines relarguées dans le surnageant après centrifugation à 15 000 g, 30 min. Les taux protéiques étant déterminés par la méthode de Markwell, la courbe étalon est préparée en présence des concentrations en détergent utilisées pour la solubilisation des membranes, afin de corriger d'éventuelles déviations. Une comparaison des profils protéiques des différentes fractions ainsi obtenues a été faite en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS) selon la méthode Laemmli (31) (cf. annexe technique). L'antigénicité des différentes fractions solubles est contrôlée par réaction d'immunoélectrodifusion de Laurell (32) (cf annexe technique).

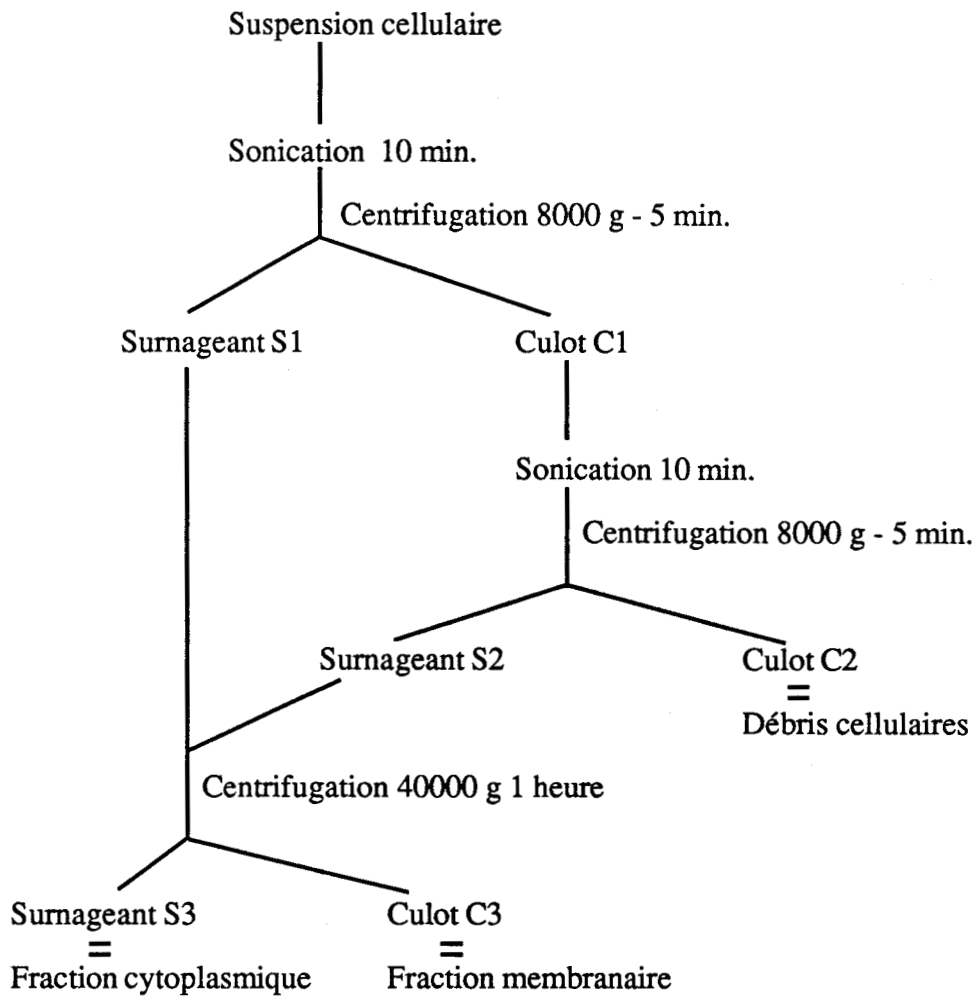
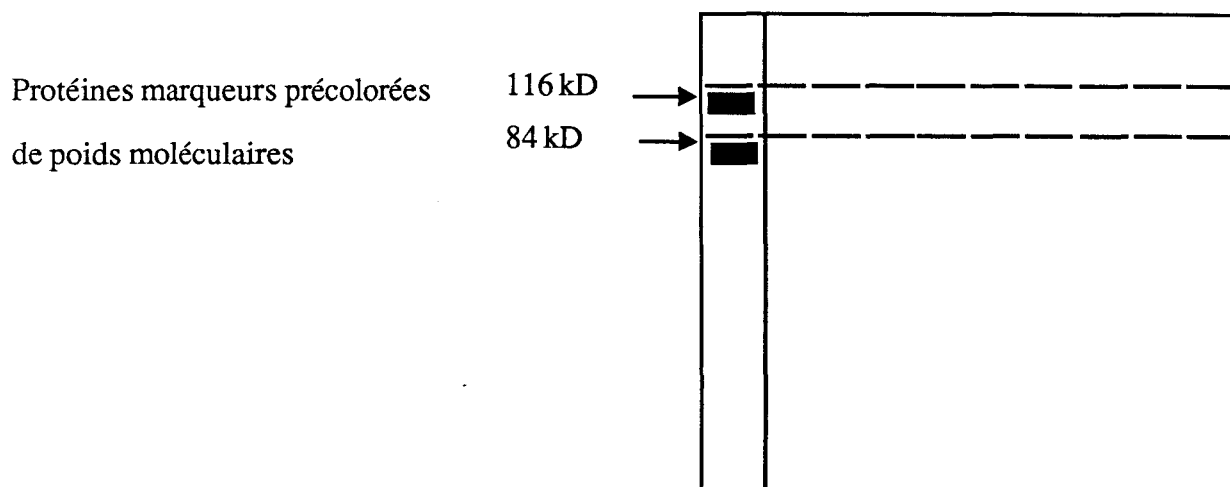


Figure 4 : Procédure de séparation des fractions cytoplasmiques et membranaires selon Hollingdale (24)

C/ Préparation d'antigènes protéiques membranaires de *M. hominis* par électroélution

Les protéines d'une suspension membranaire de *M. hominis* PG 21 sont fractionnées durant 2h 30 sur PAGE-SDS 10% (cf. annexe technique). Après migration, le gel est démoulé et une bande est découpée au scalpel suivant le schéma :



Le reste du gel est coloré puis décoloré afin de vérifier si la découpe a été effectuée au niveau voulu. Les protéines marqueurs de masses moléculaires précolorées de 116 kD et 84 kD subissent l'électroélution dans un tube à part ; ce tube marqueur permet de déterminer le temps de l'électroélution.

Les tubes utilisés pour l'électroélution sont des tubes de 85 mm de long, ayant leur extrémité inférieure réduite à un diamètre de 4 mm afin d'éviter tout glissement du gel hors du tube lors de l'électroélution. Après avoir scellé les tubes avec du parafilm, 2,5 ml de gel de concentration à 5 % d'acrylamide (cf. annexe technique) sont versés par tube et laissés à polymériser 1 h à température ambiante.

Montage des tubes (figure 5) :

- Des tubes de dialyse de 6 mm de diamètre sont découpés, fermés à l'une des extrémités par un double nœud, remplis de tampon d'électroélution et fixés à la base de chaque tube avec un bracelet élastique.

- Des fragments de gel contenant les protéines à extraire sont ensuite introduits dans les tubes d'élution. Les parois des tubes sont nettoyées avec un peu de tampon d'électroélution à 10 % de glycérol. Les fragments de gel forment avec le tampon glycérolé une couche bien distincte au dessus du gel de support.
- Les tubes sont remplis par du tampon électrophorèse pH 8,3 contenant un agent réducteur : le dithiothréitol (DTT) à une concentration finale de 1 mM ainsi qu'un anti protéase : le phénylméthylsulfonide fluoride (PMSF) à une concentration finale de 0,1 mM.

L'élution électrophorétique s'effectue sous une intensité constante de 16 mA par tube d'élution avec le tampon de migration pH 8,3 (PMSF 0,1 mM, DTT 1 mM).

Quand toutes les protéines marqueurs précolorées sont dans le sac de dialyse, l'électroéluat est récupéré en aspirant le contenu des sacs de dialyse avec une seringue et une aiguille - 1 ml environ est récupéré par tube d'électroélution.

Un dosage des protéines est effectué afin d'évaluer le rendement d'électroélution, en posant :

$$\text{rendement d'électroélution} = \frac{\text{teneur protéique de l'électroéluat (mg/ml)}}{\text{Quantité totale de protéines soumises à l'électroélution} \times A \%} \times 100$$

A % étant la proportion représentée par la protéine électroéluée par rapport à l'ensemble des protéines membranaires. Pour les protéines 102-116 kD, A % peut être évaluée à 20 %.

L'antigénicité de l'électroéluat est vérifié par une réaction d'immunoprécipitation d'Ouchterlony.

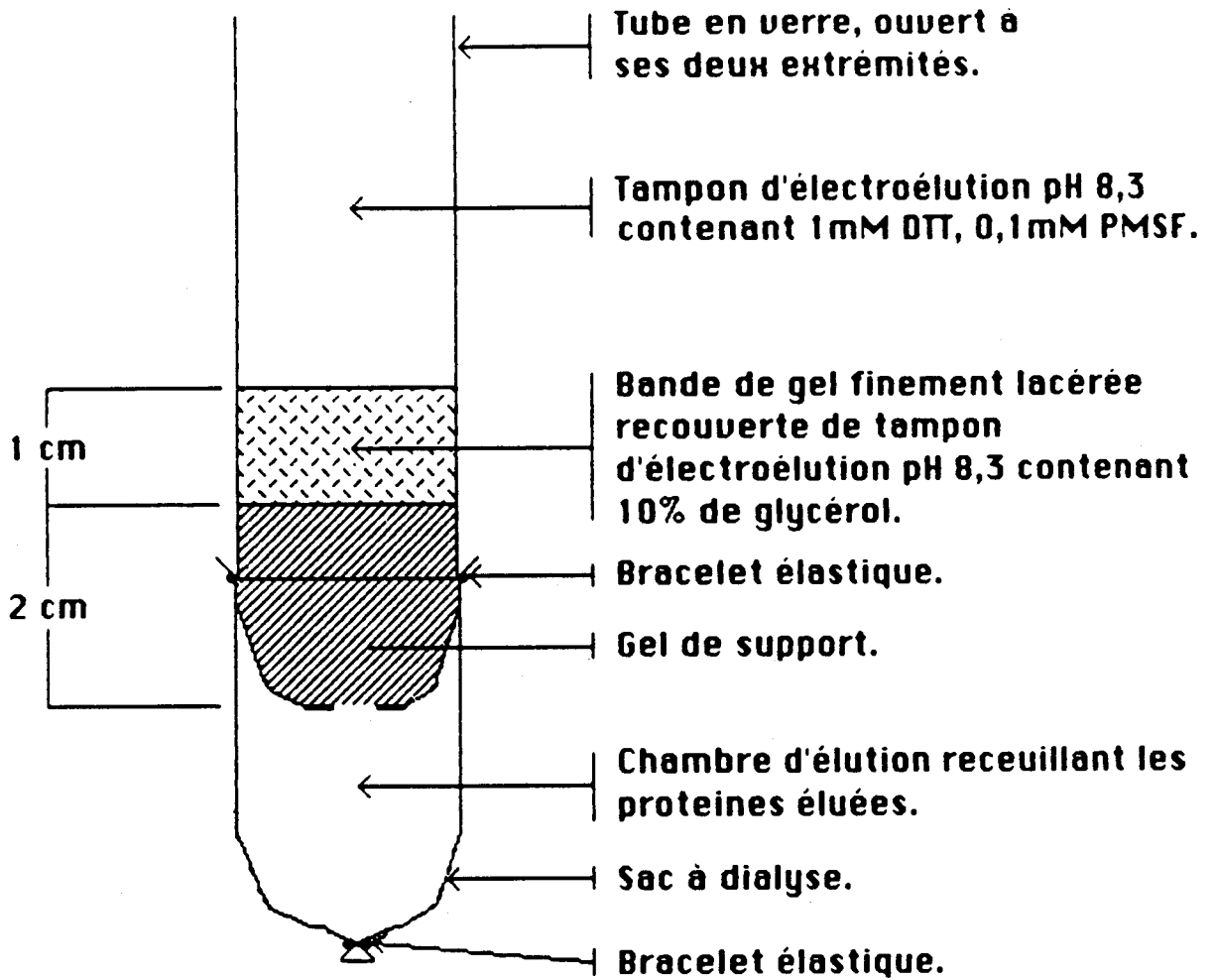


Figure 5 : Schéma de montage des tubes d'électroélution

IVPREPARATION D'ANTICORPS ANTI-*M.HOMINIS* ET ANTI-*U. UREALYTICUM*

A/Immunsérum de lapin

Les membranes de *M. hominis* PG 21 et d'*U. urealyticum* types 1 à 8 ont été utilisées pour immuniser des lapins néo-zélandais albinos. Ceux-ci sont inoculés par plusieurs injections intradermiques au niveau du dos, avec un mélange à parties égales de suspensions membranaires (0,5 mg/ml) et d'adjuvant complet de Freund. Le même volume de matériel injecté, mais sans adjonction d'adjuvant est injecté par voie intraveineuse 3 semaines plus tard. Des prélèvements sanguins sont effectués au 20ème et 34ème jours au niveau de la veine marginale de l'oreille afin de contrôler l'immunisation. Une prise de sang avant toute injection constitue le sérum de contrôle négatif.

B/Immunoglobulines de souris

1) Anticorps spécifiques anti *M. hominis*

L'électroéluat de *Mycoplasma hominis* a été utilisé pour immuniser des souris mâles C57 black/6. Cinq souris sont inoculées par injection intradermique au niveau du dos, avec un mélange à parties égales de protéines électroéluées (0,05 mg/0,1 ml) et d'adjuvant complet de Freund. Cinq autres souris sont inoculées par injection intrapéritonéale, avec un mélange à parties égales de protéines électroéluées (0,05 mg/0,1 ml) et d'eau physiologique (NaCl 0,15 M). Les 10 souris subissent une deuxième injection sous cutanée 15 jours plus tard avec la même dose. Des prélèvements sanguins, par ponction des sinus caverneux, sont effectués les 14ème et 20ème jours afin de contrôler l'immunisation. Des prélèvements sanguins sur des souris n'ayant subi aucune injection, ont servi de sérum de contrôle négatif.

2) Anticorps anti-*Ureaplasma*

a) Préparation de l'antigène de "groupe"

Les 8 fractions membranaires, correspondant au 8 sérovars, ont servi d'antigène dans un western-blotting (cf. annexe technique) contre les immunsérums de lapin anti-*ureaplasma*.

Après révélation des bandes, une bandelette correspondant à la zone 48-58 kD est découpée. La bandelette est ensuite dissoute dans du DMSO 10 % dans l'eau physiologique et l'antigène pour l'immunisation est préparé à part égale avec de l'adjuvant complet de Freund.

b) Immunisation

Cinq souris mâles C57 black/6 sont inoculées par voie intradermique. Une deuxième injection est effectuée 15 jours plus tard. Des prélèvements sanguins par ponction des sinus caverneux sont effectués les 14^{ème} et 20^{ème} jours afin de contrôler l'immunisation.

3) Purification

a) Précipitation au sulfate d'ammonium

Après centrifugation à 3000 g, 15 min à + 15°C (Jouan K 101), des immunosérums des souris, les surnageants sont repris et dilués au 1/2 dans l'eau physiologique (NaCl 0,15 M). Une précipitation de ces solutions par un volume égal de sulfate d'ammonium est faite, par ajout goutte à goutte de celui-ci sous agitation.

Le sulfate d'ammonium est utilisé à saturation. Les tubes sont laissés 15 minutes à la température du laboratoire puis centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes à + 10°C (Jouan K 101), les culots sont repris dans 2 ml d'eau physiologique. Une telle procédure permet la précipitation de 90 % des IgG, de 100 % des IgM et de 50 % d'albumine. Afin d'éliminer le sulfate d'ammonium, les échantillons subissent une dialyse contre du NaCl 50 mM, 20 h à + 4°C.

Afin de vérifier si le sulfate d'ammonium est éliminé, un test au chlorure de Baryum est effectué : sur une petite quantité de dialysat, un égal volume de BaCl₂ est ajouté. L'apparition d'un précipité signe encore la présence de (NH₄)₂ SO₄.

b) Chromatographie d'échange d'ions

Les échantillons sont entièrement déposés sur colonnes d'échange d'ions DEAE trisacryl (IBF) équilibrées par du tampon Tris-Hcl pH 8,8 (Tris 25 mM, NaCl 35 mM). Après élution par du tampon Tris-Hcl pH 8,8 (Tris 25 mM, NaCl 80 mM), des fractions de 1 ml sont recueillies et lues au spectrophotomètre U.V. à 280 nm. Ce type de chromatographie permet d'éliminer la totalité de l'albumine restante dans les échantillons.

V APPLICATION AU DIAGNOSTIC

A/ Diagnostic indirect

Pour doser les anticorps anti-membrane d'*Ureaplasma urealyticum* et de *Mycoplasma hominis*, nous avons appliqué une méthode en phase hétérogène, non compétitive, utilisant une immunoglobuline marquée par un enzyme (29) : l'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

1) Définition des paramètres de la réaction ELISA

Avec les antigènes solubles choisis préalablement, différentes concentrations antigéniques (de 1 µg à 20 µg de protéines par ml) sont étudiées à raison de 100 µl par cupule pour déterminer la concentration optimale. De même, la sensibilité de la méthode est étudiée par diverses dilutions d'immunsérums anti *U. urealyticum* et anti *M. hominis*.

2) Application au sérum de lapin expérimental

L'antigène est dilué dans du tampon carbonate 0,1 M pH 9,6. Cent microlitres de chaque antigène dilué sont déposés dans chacune des cupules de plaques de microtitration (Nunc). Après incubation d'une nuit à température ambiante, les plaques sont saturées avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20 et 3 % de sérum de cheval (PBS-TC), 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages en tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBS-T), pour éliminer l'excès d'antigène, 100 µl de chaque dilution d'un immunsérum de lapin anti-*Ureaplasma* ou anti-*M. hominis* (selon les antigènes), dilué dans du PBS-TC, sont déposés dans les cupules correspondantes.

Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées comme précédemment pour éliminer l'excès d'anticorps, et incubées de nouveau pendant 1 heure à température ambiante en présence de 100 µl par cupule de conjugué dilué au 1/8000 dans le tampon PBS-TC. Après quatre nouveaux lavages, 100 µl de substrat enzymatique (eau oxygénée : H₂O₂) à raison de 0,4 µl/ml de tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5, contenant 0,04 % d'orthophénylène diamine (OPD) sont ajoutés. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à 37°C, la réaction est stoppée par addition de 50 µl de HCl 4N, par cupule. La densité optique est mesurée sur un spectrophotomètre Behring ELISA processor II à 490 nm.

3) Application aux sérums humains : détection d'anticorps IgG

Le conjugué enzymatique utilisé est un anticorps anti-IgG humaine (chaîne) marqué à la peroxydase (Biosys) utilisé à la dilution 1/8000.

Dans un premier temps, la sensibilité de la méthode est étudiée à l'aide de 3 pools de sérum :

- 1 pool de sérum négatif de 15 personnes provenant du Centre Régional de Transfusion Sanguine (CRTS)
- 1 pool de sérum positif de 15 personnes connues comme étant positives en culture *M. hominis* (culture $\geq 10^4$ /ml) et négatives en *U. urealyticum*.
- 1 pool de sérum positif de 15 personnes connues comme étant positives en culture *U. urealyticum* (culture $\geq 10^4$ /ml) et négatives en *M. hominis*.

Dans un deuxième temps, 150 sérums de patients sont étudiés en ELISA IgG.

B/ Diagnostic direct

Pour rechercher les antigènes *M. hominis* ou *U. urealyticum*, nous avons appliqué une méthode immunoenzymatique : l'Immunobinding Assay = IBA (30).

1) Spécificité des anticorps

Les souches en milieu A3 (cf. annexe technique) : *Mycoplasma hominis* PG 21 ; *Ureaplasma urealyticum* 1 à 8 ; *Mycoplasma fermentans* PG 18; *Mycoplasma pneumoniae* FH; *Mycoplasma salivarium* A 889, *Mycoplasma orale* TS 19 et *Mycoplasma arginini* G 230 sont utilisées comme antigènes dans le test IBA. Chaque suspension est appliquée sous forme de taches de 10 µl, sur des bandelettes de nitrocellulose. Les bandelettes sont saturées 1 heure sous agitation, à température ambiante, par du tampon tris 50 mM - NaCl 200 mM pH 7,4 (TBS = tris buffer saline) contenant 10 % de sérum de cheval et 0,02 % de Tween 20 -(TBS-CT), les anti-sérums de souris sont ajoutés et incubés 1 h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages de 3 minutes chacun en tampon TBS, des anti-immunoglobulines de souris marquées à la peroxydase et diluées au 1/8000 en tampon TBS-CT, sont ajoutées et incubées 1 h à température ambiante sous agitation.

Après 3 nouveaux lavages en tampon TBS, du diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) dilué à 0,04 % dans du tampon TBS contenant 0,1 % H₂O₂ est ajouté. En quelques secondes, nous pouvons observer l'apparition d'une tache pourpre si la réaction est positive. Le substrat est enlevé et les bandelettes sont agitées avec de l'eau bidistillée.

2) Application aux prélèvements vaginaux

Avant d'effectuer le test, les prélèvements en milieu A3 sont dilués au 1/2 dans du tampon TBS, agités vigoureusement et centrifugés à 11000 g pendant 15 minutes (Beckman microfuge). Les culots sont récupérés, mis en suspension dans 200 µl de TBS et utilisés dans le test IBA.

RESULTATS

I PREPARATION DES ANTIGENE

1) Introduction

En ce qui concerne *Ureaplasma urealyticum*, l'existence de 14 sérotypes doit être prise en compte. La littérature étant divisée sur le fait que la détection des anticorps anti-ureaplasma doit se faire à l'aide de 1 ou plusieurs sérovars, nous avons, dans une étude préliminaire, comparé 8 sérotypes d'ureaplasma (type 1 à 8). Pour ce faire, les membranes de chaque sérotype furent utilisées comme antigènes dans la détection d'anticorps anti-Ureaplasma, chez 40 sérums de patientes connues comme étant positives en culture pour des taux $\geq 10^4$ colonies/ml.

Le résultat de cette étude (figure 6) montre que les types 1 et 8 sont largement reconnus dans notre région. Aussi, nous avons choisi d'utiliser un mélange des types 1 et 8 comme antigène dans la détection d'anticorps anti-Ureaplasma.

D.O. (492 nm)

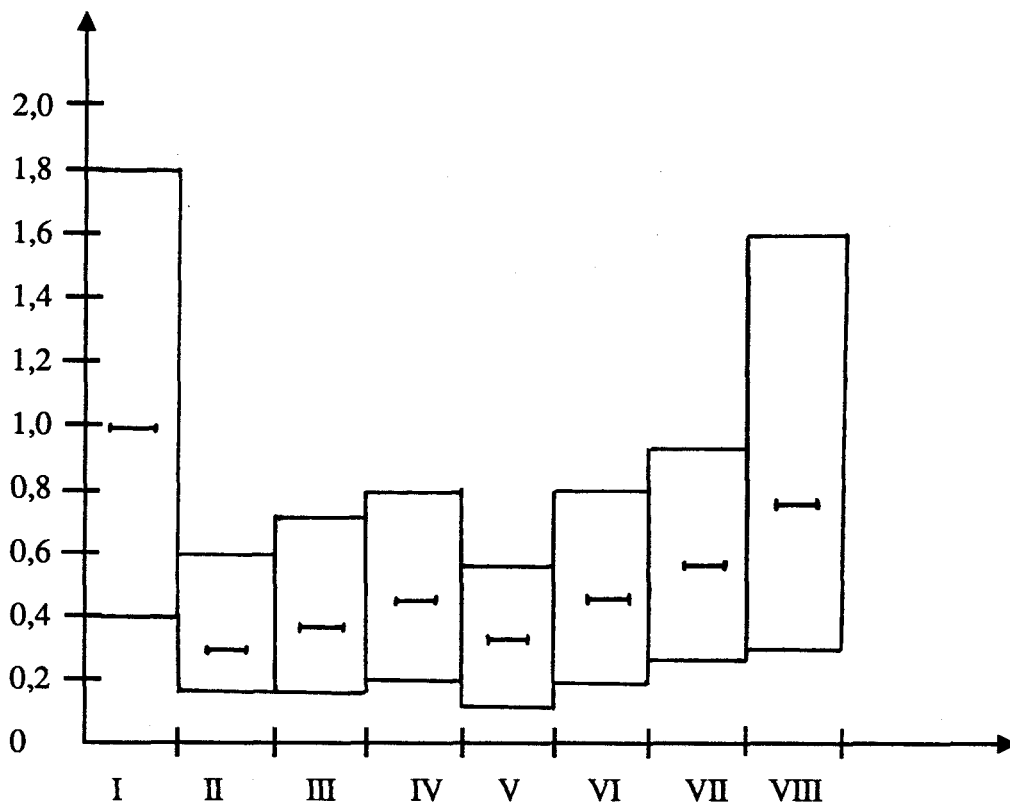


Figure 6 : Taux d'anticorps chez 40 patientes infectées par *U. urealyticum* vis-à-vis des 8 sérotypes (——— : moyenne des densités optiques).

En ce qui concerne *Mycoplasma hominis*, l'existence de sérovars n'étant pas reconnue, notre choix s'est porté sur la souche PG 21 qui est d'origine vaginale.

En 1969, Kahane et Razin affirmaient que l'analyse sérologique était rendue difficile à cause de la solubilisation des antigènes membranaires de nature protéique. Cette solubilisation nécessitant l'intervention de détergents, nous avons comparé plusieurs types de détergents, afin de choisir celui qui permettrait un rendement de solubilisation intéressant tout en conservant au mieux l'activité biologique.

Des réactions croisées entre les genres *Ureaplasma* et *Mycoplasma*, n'ayant jamais été trouvées (33, 11) l'utilisation d'un antigène membranaire soluble pour les *Ureaplasma*, dans un test sérologique de type ELISA semble acceptable. Par contre, au sein du groupe *Mycoplasma*, des réactions croisées existent entre les espèces (62), aussi nous avons comparé un antigène membranaire soluble et un antigène protéique soluble spécifique de *M. hominis* afin d'éliminer ces réactions. Le choix de cet antigène protéique s'est porté sur les protéines 102 et 116 kD. En effet, certains auteurs ont démontré que la protéine 102 kD était présente chez 14 souches différentes isolées à partir de 14 prélèvements et que les antisérums obtenus chez le lapin de ces 14 souches reconnaissaient tous ces protéines (14) ; d'autre part, 95 % des sérums humains de patients infectés possèdent des anticorps vis-à-vis de ces protéines (3).

2) La lyse

Mycoplasma hominis et *Ureaplasma urealyticum* sont sensibles à la lyse par ultrasons en solution NaCl 0,25 M. La sensibilité de la lyse est dépendante du temps d'exposition aux ultrasons : 10 minutes d'exposition sont nécessaires (figure 7).

3) Solubilisation des membranes

Le procédé de la solubilisation des membranes de *M. hominis* et *U. urealyticum* a été appréciée par 3 techniques : a) la mesure à 500 nm de la chute de la turbidité ; b) la quantité de protéines relarguées dans le surnageant après centrifugation ; c) la distribution des protéines membranaires dans le culot et le surnageant, par comparaison des profils électrophorétiques.

D.O. (490nm)

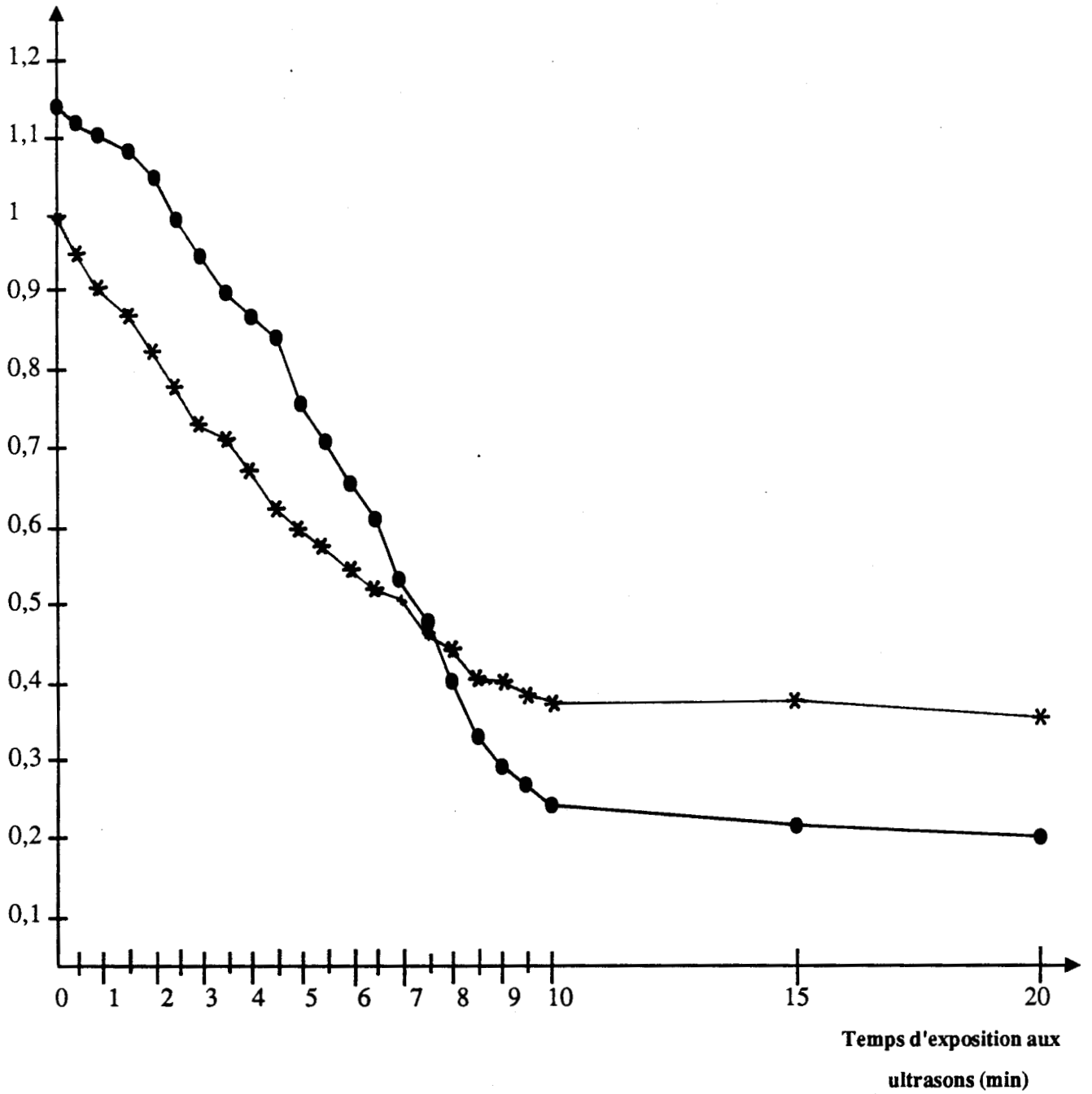


Figure 7 : Cinétique de la lyse de *Mycoplasma hominis* (•) et d'*Ureaplasma urealyticum* (+).

a) Changement de la turbidité

Des quantités croissantes de détergents sont additionnées aux échantillons membranaires à pH 7,5 et à 25°C. La densité optique est lue à 500 nm contre un blanc d'eau distillée (figure 8A- 8B). Une chute rapide de la turbidité est observée avec le SDS et le CTAB à 10 % de la valeur initiale, 20 % pour le DOC, 40 % pour le NP40 et 50 % pour le CHAPS. Nous observons ensuite l'apparition d'un plateau.

b) Relarguage des protéines

Les taux protéiques trouvés dans les surnageants après centrifugation à 37000 g pendant 1 heure sont représentés figure 9 (9a-9b). L'addition de 2 mg de détergents/ml fait que nous retrouvons dans les surnageants, 95 % et 93 % des protéines membranaires pour le SDS et le CTAB, 80 % pour le DOC, 60 % pour le NP40 et 45 % pour le CHAPS en ce qui concerne *M. hominis*. Pour *U. urealyticum*, nous trouvons 89 et 92 % pour CTAB et SDS, 78 % pour le DOC, 78 % pour le NP- 40, 30 % pour le CHAPS.

c) Profils électrophorétiques (figure 10a-10b)

Les profils protéiques des surnageants comparés à ceux des culots, obtenus après action des différents détergents, montrent, pour le SDS et le CTAB, que la majorité des bandes protéiques sont retrouvées dans le surnageant. En ce qui concerne les autres détergents, les bandes protéiques sont distribuées différemment dans les culots et les surnageants, sans disparaître complètement de chacun. Le CHAPS constitue une exception dans la mesure où les protéines immunologiquement importantes se situent en majorité dans le culot.

4) Etude de l'antigénicité

L'étude de l'antigénicité des différentes fractions solubles à été étudiée par la méthode d'immunoelectrodifusion de Laurell (32) (cf. annexe technique) (figure 11). Le pic de précipitation le plus intense est obtenu avec le DOC, puis par ordre d'intensité décroissante avec le NP-40, le SDS et le CTAB, le CHAPS ne donnant aucun pic.

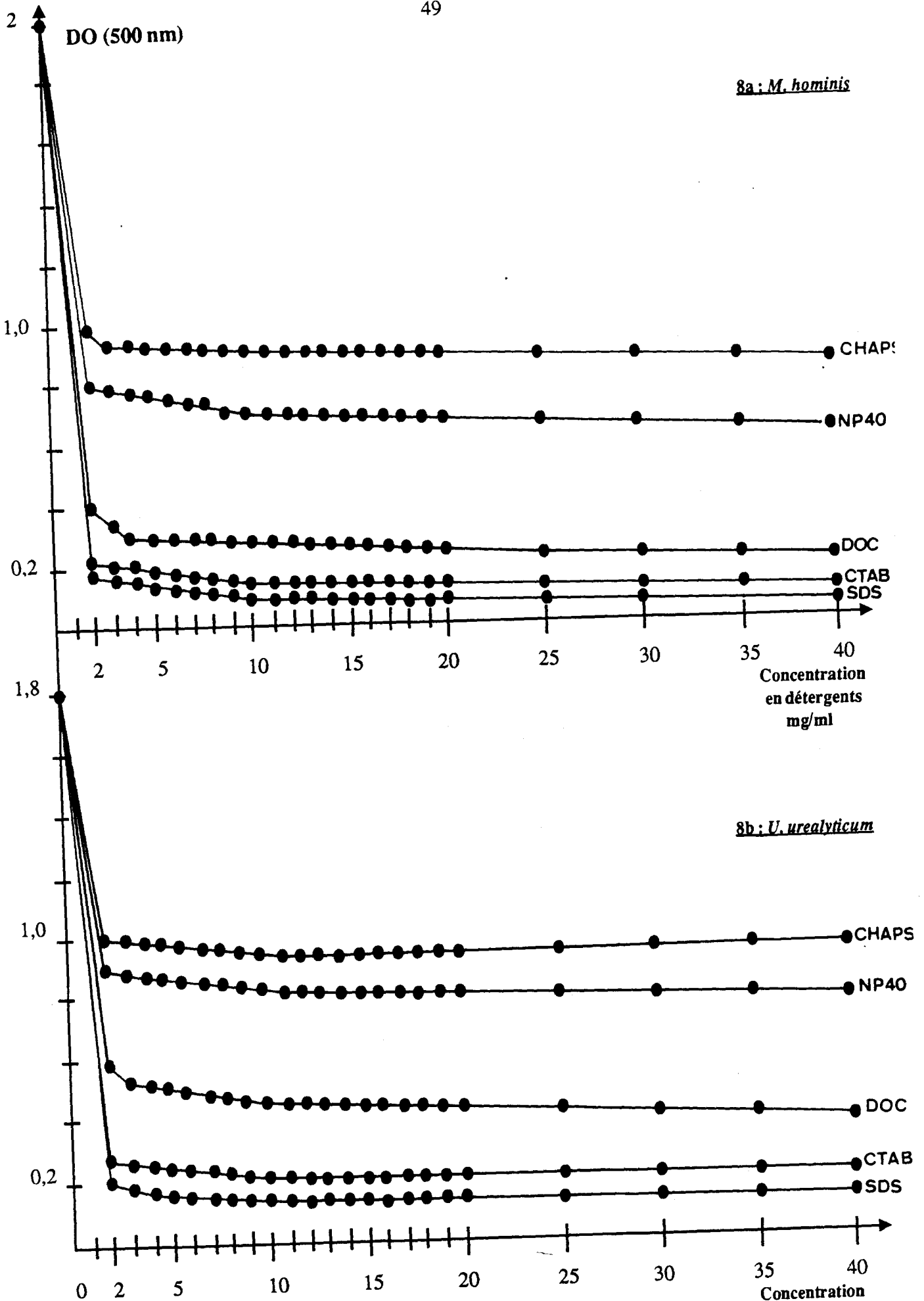


Figure 8: Etude de la solubilisation des membranes: Chute de la densité optique à 500 nm en fonction des concentrations en détergents.

5) Choix de l'antigène soluble

Tableau 1 : Récapitulatif sur la solubilisation des protéines

	DETERGENTS				
	SDS	CTAB	CHAPS	DOC	NP40
<i>M. hominis</i> % Solubilisation (taux protéines solubles)	95	93	45	80	60
Antigénicité (hauteur du pic en mm)	24	ND	5	33	7
<i>U. urealyticum</i> % Solubilisation (taux protéines solubles)	92	89	30	78	50
Antigénicité (hauteur du pic en mm)	17	ND	10	29	11

Le DOC semble occuper une position intermédiaire entre les détergents fortement ioniques (SDS et CTAB) et non ioniques (NP-40). Notre choix pour la solubilisation d'antigènes se porte sur le déoxycholate de sodium.

6) Electroélution

Approximativement 10 mg de protéines de *M. hominis* dans 4 ml de tampon électroélution sont obtenus en une seule fois par électroélution de 70 mg de protéines membranaires. La fraction membranaire et l'électroéluat montrent les mêmes protéines entre 84 et 116 kD (figure 12). Le rendement de l'électroélution est de 71 %. L'antigénicité de l'électroéluat est vérifiée par une réaction d'immunoprécipitation d'Ouchterlony. L'éluat obtenu est antigéniquement actif comme indiqué sur la figure 13. Une bande de précipitation spécifique se forme par immuno-diffusion dans l'agar entre la solution de protéines électroéluées et l'immunoserum de lapin correspondant.

% protéique

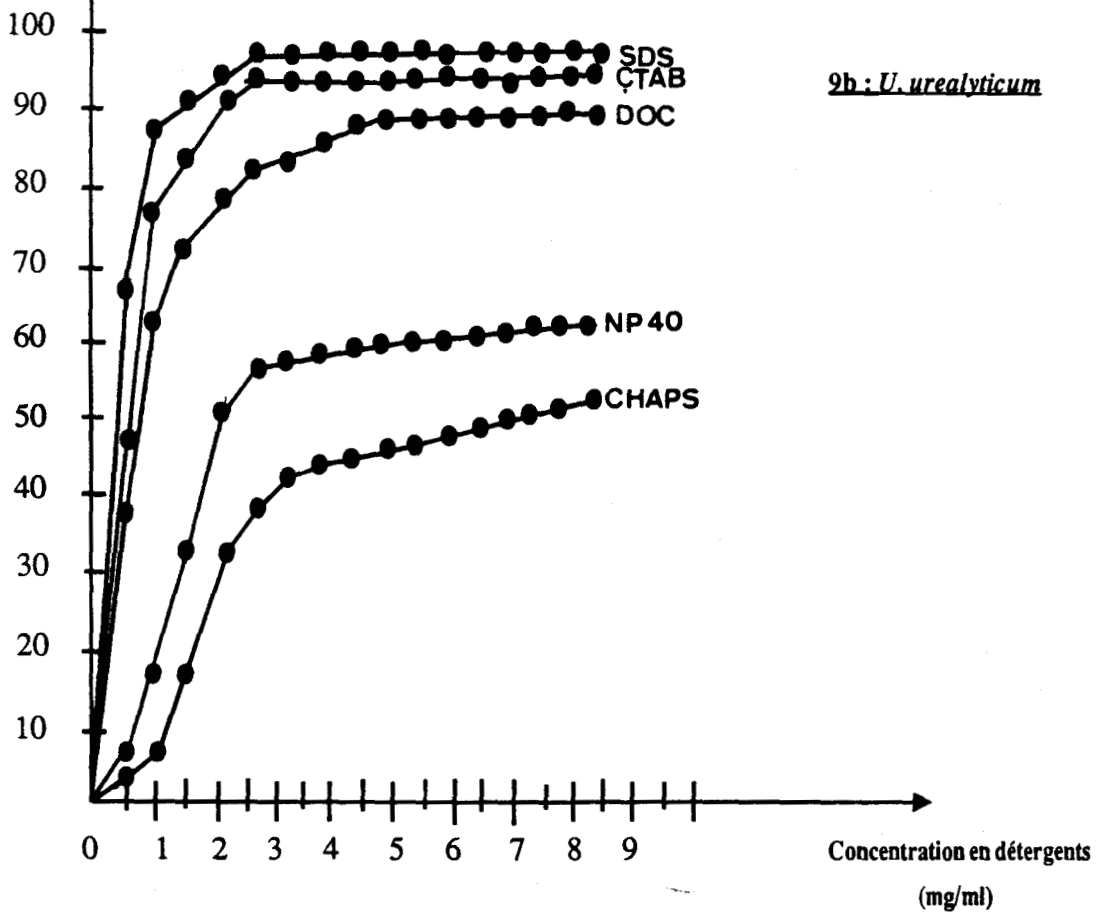
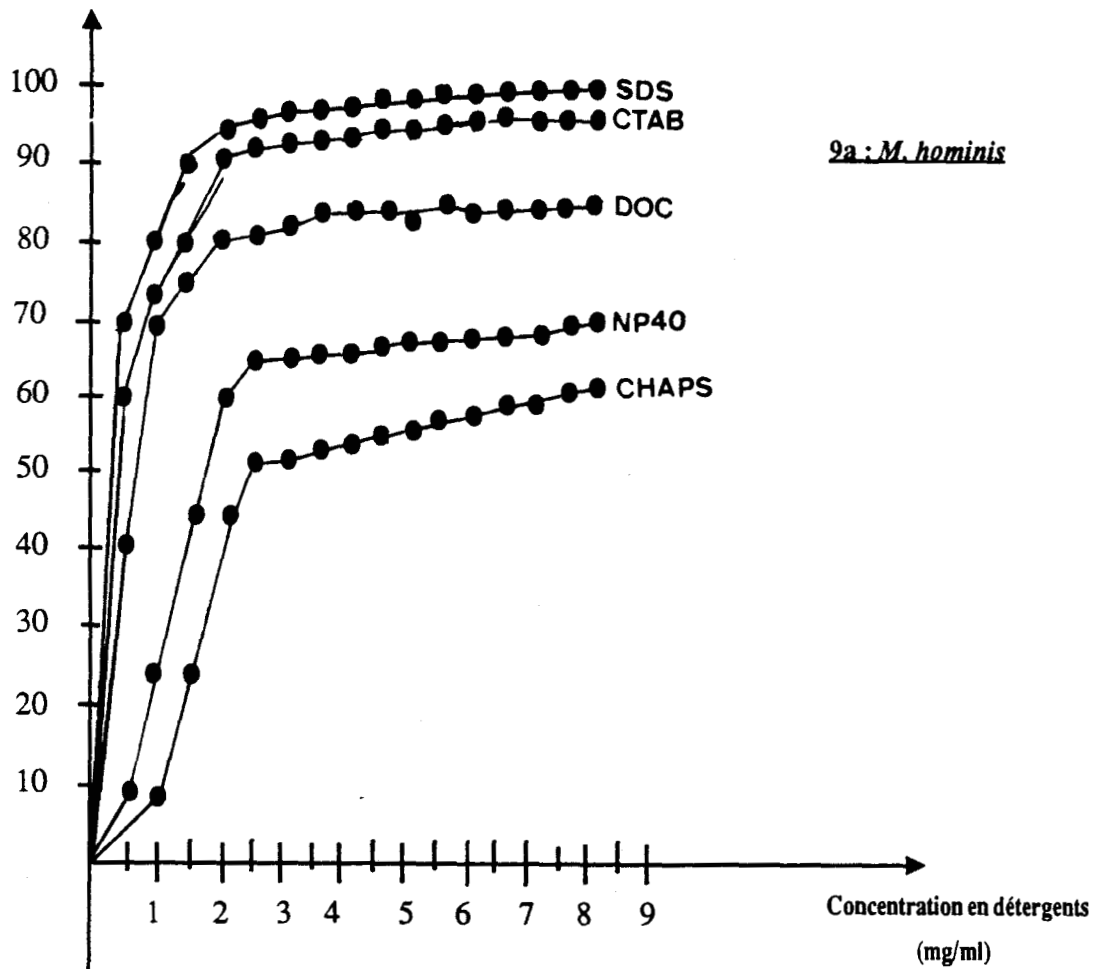


Figure 9: Pourcentage de protéines libérées dans le surnageant en fonction de la concentration en détergents

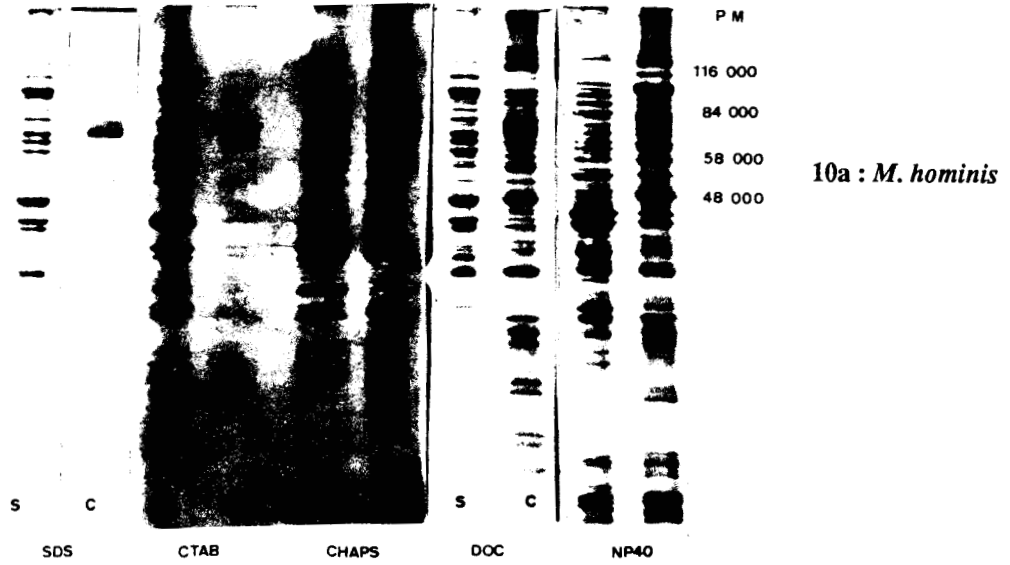
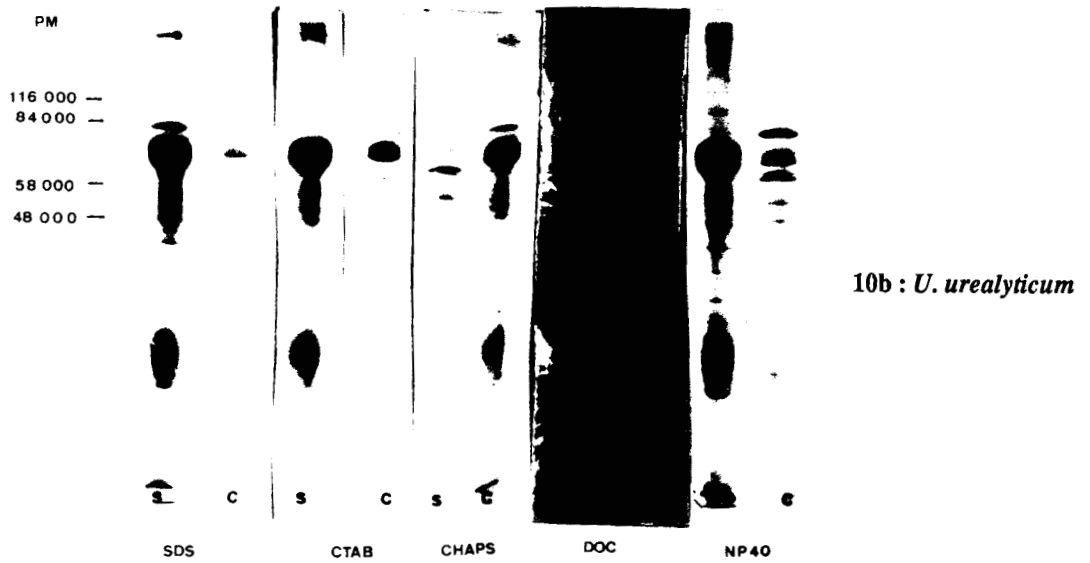


Figure 10: Profils électrophorétiques des protéines membranaires solubles de *M. hominis* et d'*U. urealyticum*. (*S*= surnageant; *C*= culot)



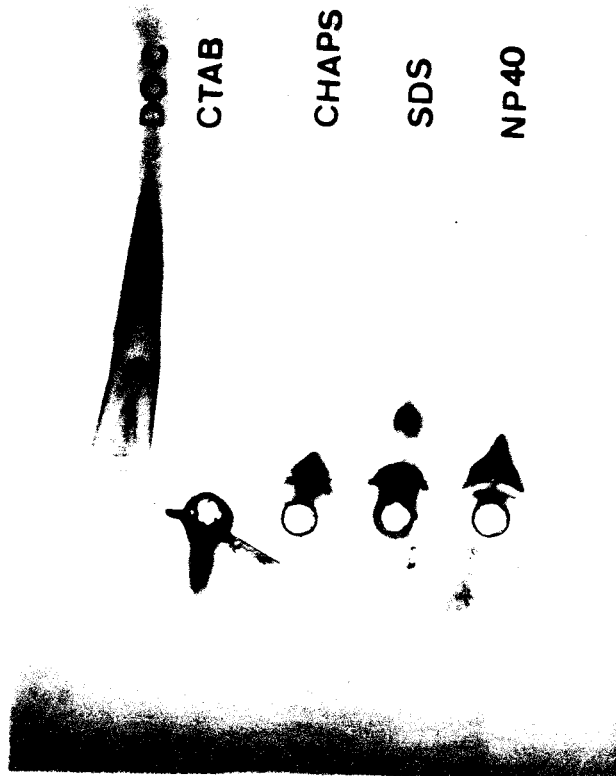
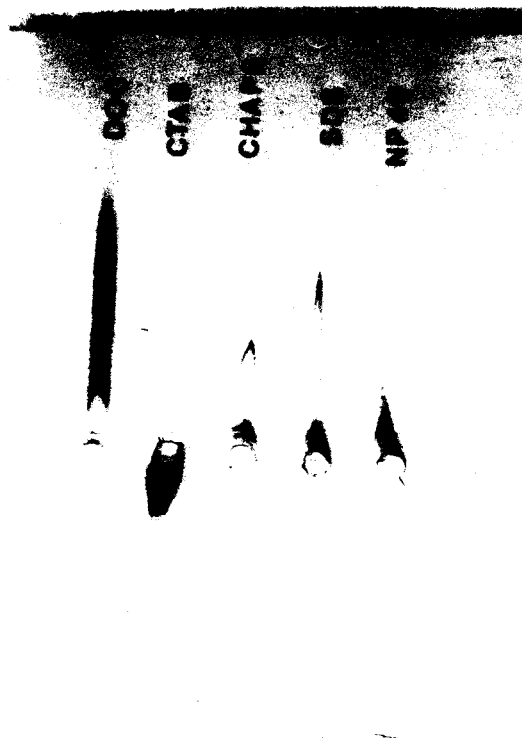


Figure 11 : Réactions d'immunoprécipitation électrophétique d'un immunsérum de lapin anti-membranaires *M. hominis* (11a) et d'un immunsérum de lapin anti-membranaires *U. urealyticum* (11b) vis-à-vis de diverses préparations antigéniques



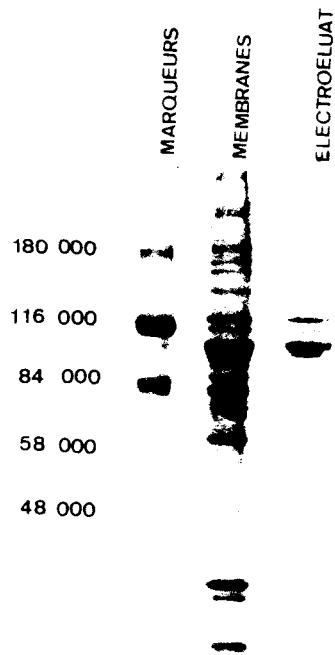


Figure 12 : Profil électrophorétique de l'électroeluat de *M. hominis*



Figure 13 : Réaction d'immunoprécipitation entre l'immunsérum de lapin anti-membranaire de *M. hominis* et l'électroéluat (3).

1. Contrôle : tampon d'électro-élution
2. Contrôle : milieu de culture
3. Electroéluat
4. Membranes solubilisées dans du DOC

II PREPARATION DES ANTICORPS

1) Introduction

Après l'immunisation de lapins à l'aide des antigènes membranaires bruts, une immunisation de souris, organisme plus petit, est menée en regard de la faible quantité d'antigènes disponibles (électroéluat ou bandes d'immunoblotting solubilisées).

Dans la mise au point d'un test de diagnostic biologique, il est nécessaire, non seulement de posséder des antigènes mais aussi des anticorps de bonne qualité.

Pour le test ELISA, des anticorps anti-membranes totales d'*U. urealyticum* ou *M. hominis* se sont révélés adaptés alors que pour le test IBA, la nécessité de préparer des anticorps anti-protéines bactériennes spécifiques d'espèce s'est fait jour.

2) Résultats de la purification des immunoglobulines de souris

Après précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse en tampon NaCl 50 mM, les diagrammes d'élutions des chromatographies sur DEAE trisacryl des immunsérums (figure 14) présentent un premier pic contenant les anticorps et un deuxième pic plus important contenant l'albumine. Les fractions contenant les anticorps sont rassemblées pour chaque immunsérum, concentrées et dialysées contre du NaCl 50 mM.

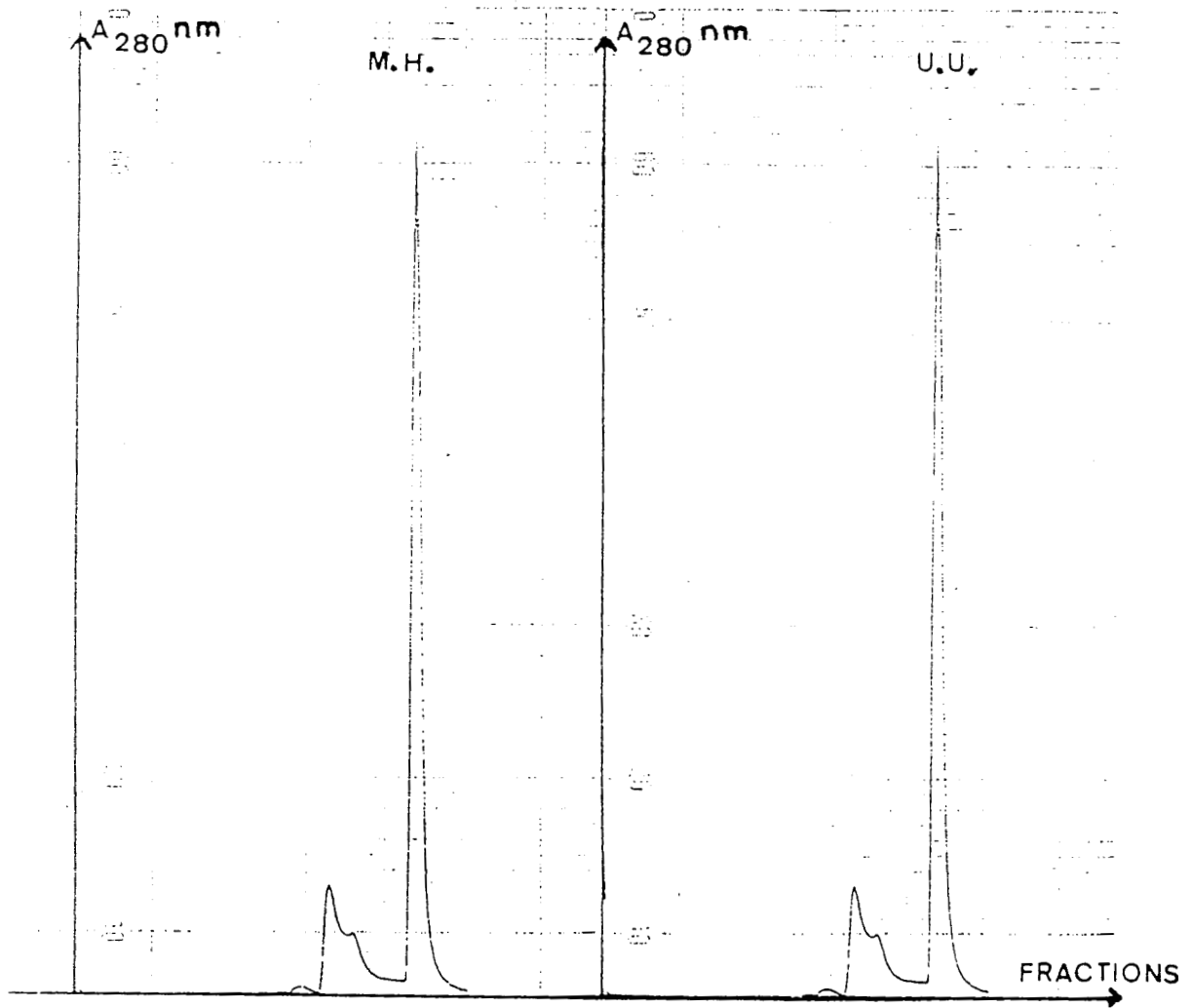


Figure 14 : Diagramme d'élution des immunosérums de souris sur DEAE Trisacryl (IBF).

III DIAGNOSTIC INDIRECT

1) Introduction

Au contraire des autres mycoplasmes pathogènes pour l'homme, (notamment *M. pneumoniae*), les structures de surface des mycoplasmes génitaux, importantes dans la réponse immune de l'hôte et la pathogénicité de la maladie, sont relativement peu définies. Une des raisons à cela peut être la nature commensale de ces deux microorganismes, *M. hominis* et *U. urealyticum*, qui en font des pathogènes possibles. En fait, la prédisposition des facteurs de l'hôte et la non virulence de ces microorganismes, apparaissent être déterminants dans le développement de la maladie et de sa sévérité.

Actuellement, le diagnostic en laboratoire est toujours établi en se fondant sur l'isolement en culture à partir de prélèvements urogénitaux et il n'existe pas encore à ce jour de sérodiagnostic, bien que la présence d'anticorps chez les sujets infectés ait été démontrée (10, 12, 23, 34,41). Il apparaît important, compte tenu de la lenteur de la culture du germe, du problème des contaminations bactériennes ou fongiques, malgré les antibiotiques ajoutés aux milieux de culture, et de la chronicité de l'infection (40 à 50 % chez l'adulte), de développer un test sérologique permettant d'évaluer l'importance de l'infection : un test ELISA-IgG est proposé.

2) Détermination de la dilution antigénique optimale

L'étude du graphe (figure 15) exprimant les D.O. en fonction de la quantité de protéines antigéniques fixée sur les cupules a montré que les conditions optimales de travail sont : 5µg de protéines antigéniques par ml ; soit 0,5 µg de protéines par cupule, pour un conjugué dilué au 1/8000.

A ces concentrations, on observe une différence significative ($\geq 0,4$) en D.O. (492 nm) entre l'immunsérum de lapin et le sérum normal de contrôle.

3) Sensibilité de la méthode

Différentes dilutions sériques ont été étudiées : 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10 000, 1/50 000 et 1/100 000èmes. Les densités optiques obtenues à 492 nm sont reportées sur une courbe en fonction du logarithme du titre de l'immunsérum (titre = inverse de la dilution du sérum).

La figure 16 indique que la densité optique (D.O.) est maximale pour une dilution de l'immunsérum de 1/10ème. La différence significative entre l'immunsérum de lapin et le sérum normal persiste jusqu'à la dilution de 1/10 000ème ($\geq 0,4$ en D.O. à 400 nm). Au-delà de cette dilution, la différence n'est plus significative ($\leq 0,2$). Pour des dilutions plus importantes, la densité optique obtenue correspond à une absorption non-spécifique des anticorps sur la cupule.

4) Spécificité de la méthode

Tableau 2: Réactions immunoenzymatiques obtenues avec différents immunserums de lapin.

Immunsérums de lapins dilués au 1/1000e	<i>Mycoplasma hominis</i> *		<i>U. urealyticum</i> (types 1+ 8)* Antigène soluble
	Antigène soluble (DOC)	Electroéluat	
<i>M. hominis</i>	1,764	0,904	0,108
<i>M. fermentans</i>	0,102	0,045	0,080
<i>M. pneumoniae</i>	0,357	0,098	0,045
<i>M. salivarium</i>	0,286	0,069	0,035
<i>M. orale</i>	0,356	0,066	0,085
<i>U. urealyticum</i>	0,148	0,054	1,984

* : les antigènes sont utilisés à la concentration de 5 µg/ml. Les résultats sont exprimés en densité optique (A 492 nm) après 30 minutes de contact.

Avec l'électroéluat, une réponse plus faible qu'avec l'antigène solubilisé par le DOC est obtenue, mais ce fait semble découler du peu de protéines présentes dans l'électroéluat. Par contre, les faibles réactions croisées observées avec les immunsérums anti *M. pneumoniae*, *M. salivarium* et *M. orale* sont éliminées en utilisant l'électroéluat comme antigène. Aucune réaction croisée entre le groupe des mycoplasma et ureaplasma n'est notée.

5) Application sérologique

Deux lots de sérums, constitués d'échantillons de sujets positifs en culture ($\geq 10^4$ /ml) pour *M. hominis* et pour *U. urealyticum* respectivement et un lot constitué d'échantillons de sujets sains, sont utilisés comme sérums positifs et négatifs afin de déterminer la dilution optimale à employer dans l'étude des sérums humains. La dilution choisie est de 1/100ème pour la détermination des anticorps IgG anti-*M. hominis* et anti-*U. urealyticum* (figure 17).

Les résultats, en fonction des différents groupes, sont répartis sur la figure 18. Leur analyse montre que :

- pour le groupe "sains", les valeurs des densités optiques ne dépassent pas 0,25. La valeur moyenne est de 0,075.
- pour le groupe "à risque", les valeurs des densités optiques atteignent un maximum de 2,2. La valeur moyenne est de 0,75 pour *M. hominis* et de 0,87 pour *U. urealyticum*.

Dans notre étude, nous établissons le seuil à 0,4.

Ainsi, en ce qui concerne *M. hominis*, sur 55 patientes qui ont une culture positive, 95 % sont séropositives et sur 45 patientes dont la culture est négative, seulement 5 % sont séropositives.

Pour *U. urealyticum*, sur 70 patientes qui ont une culture positive, 93 % sont séropositives et sur 30 patientes dont la culture est négative, 7 % sont séropositives.

Notre ELISA nous permet de détecter les anticorps *M. hominis* avec une sensibilité de 95 % et les anticorps *U. urealyticum* avec une sensibilité de 93 %.

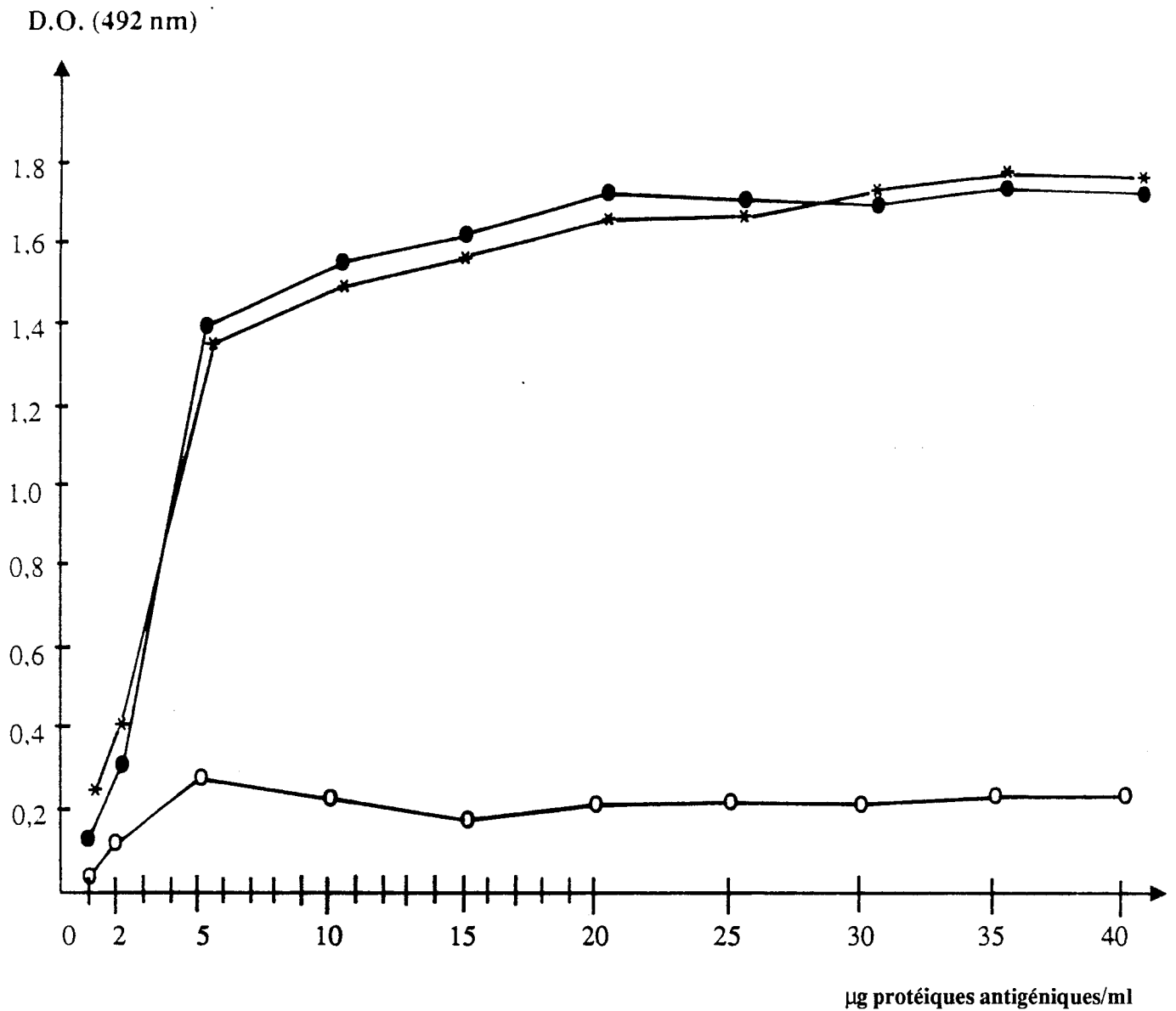


Figure 15 : Valeurs des densités optiques de l'immunsérum de lapin anti-*U. urealyticum* (*) et anti-*M. hominis* (●) et du sérum normal (o), dilués au 1/10 000ème.

D.O. (492 nm)

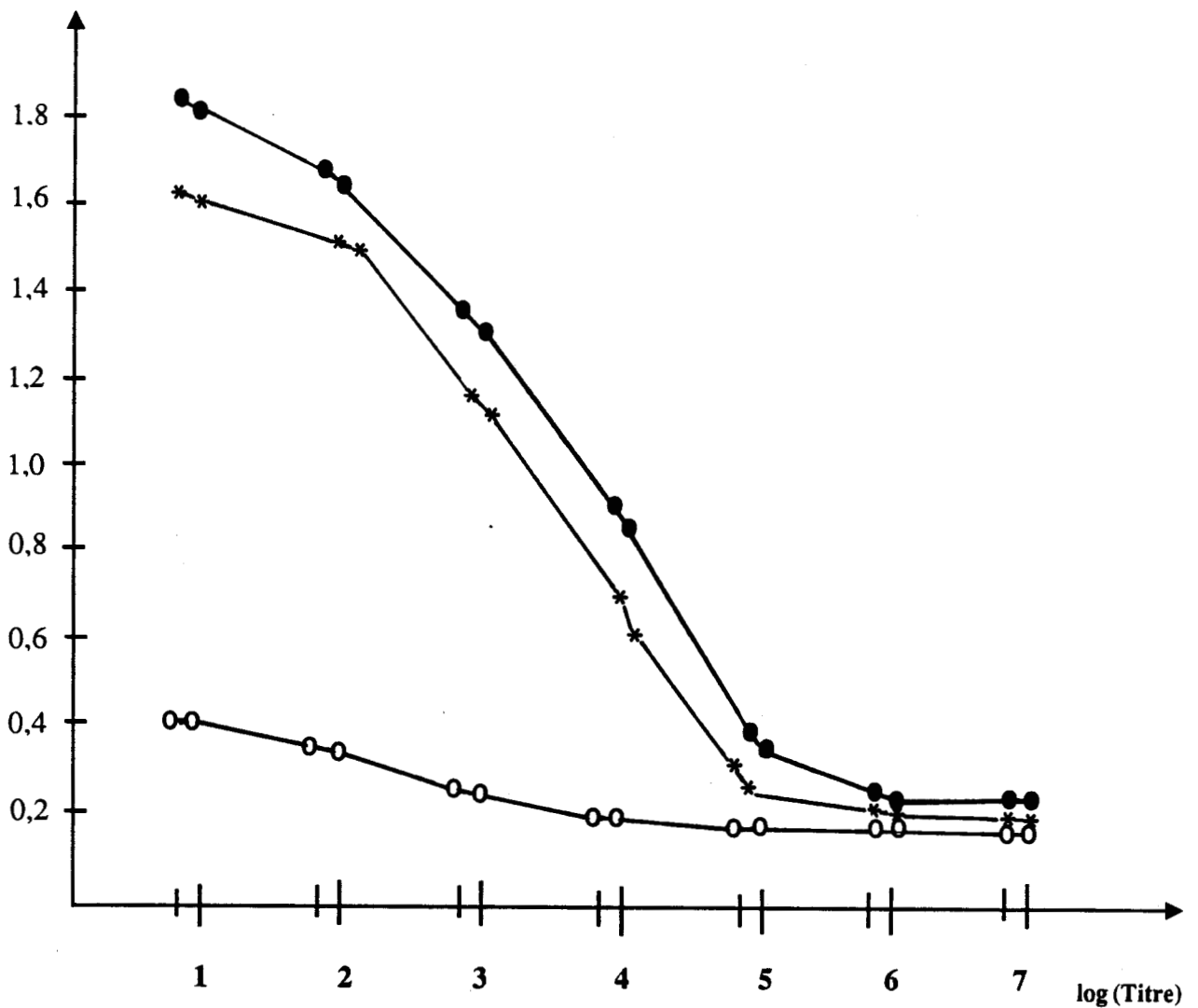


Figure 16 : Valeurs des densités optiques pour une concentration antigénique de 5 $\mu\text{g/ml}$ en fonction des dilutions sériques de lapin anti-*U. urealyticum* (*), anti-*M. hominis* (.) et du sérum normal (o)

D.O. (492 nm)

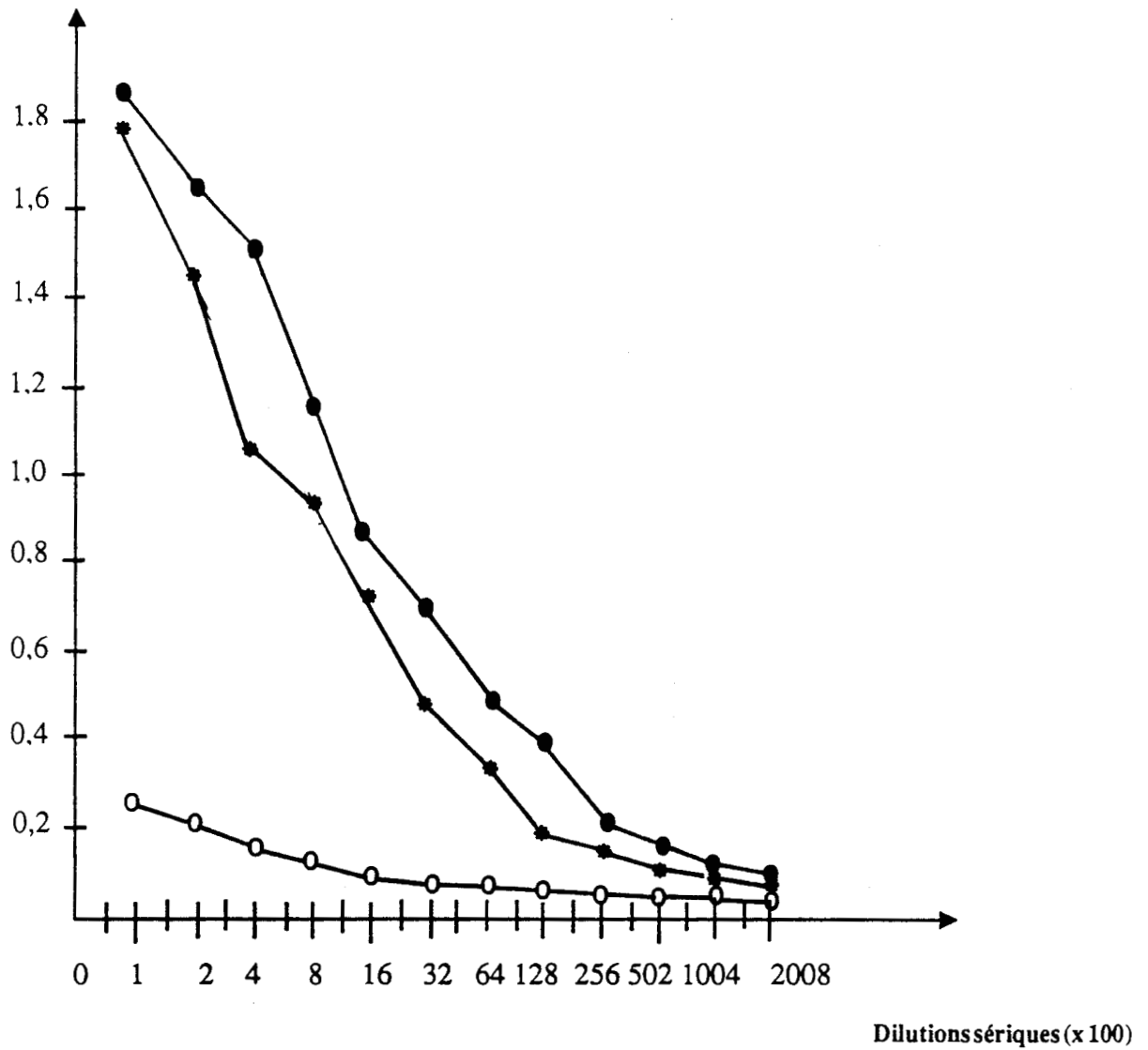


Figure: Valeurs des densités optiques en ELISA-IgG des pools de sérums de patients positifs en culture pour *U. urealyticum* (*), pour *M. hominis* (●) et des pool de sérums négatifs (○)

D.O. (492 nm)

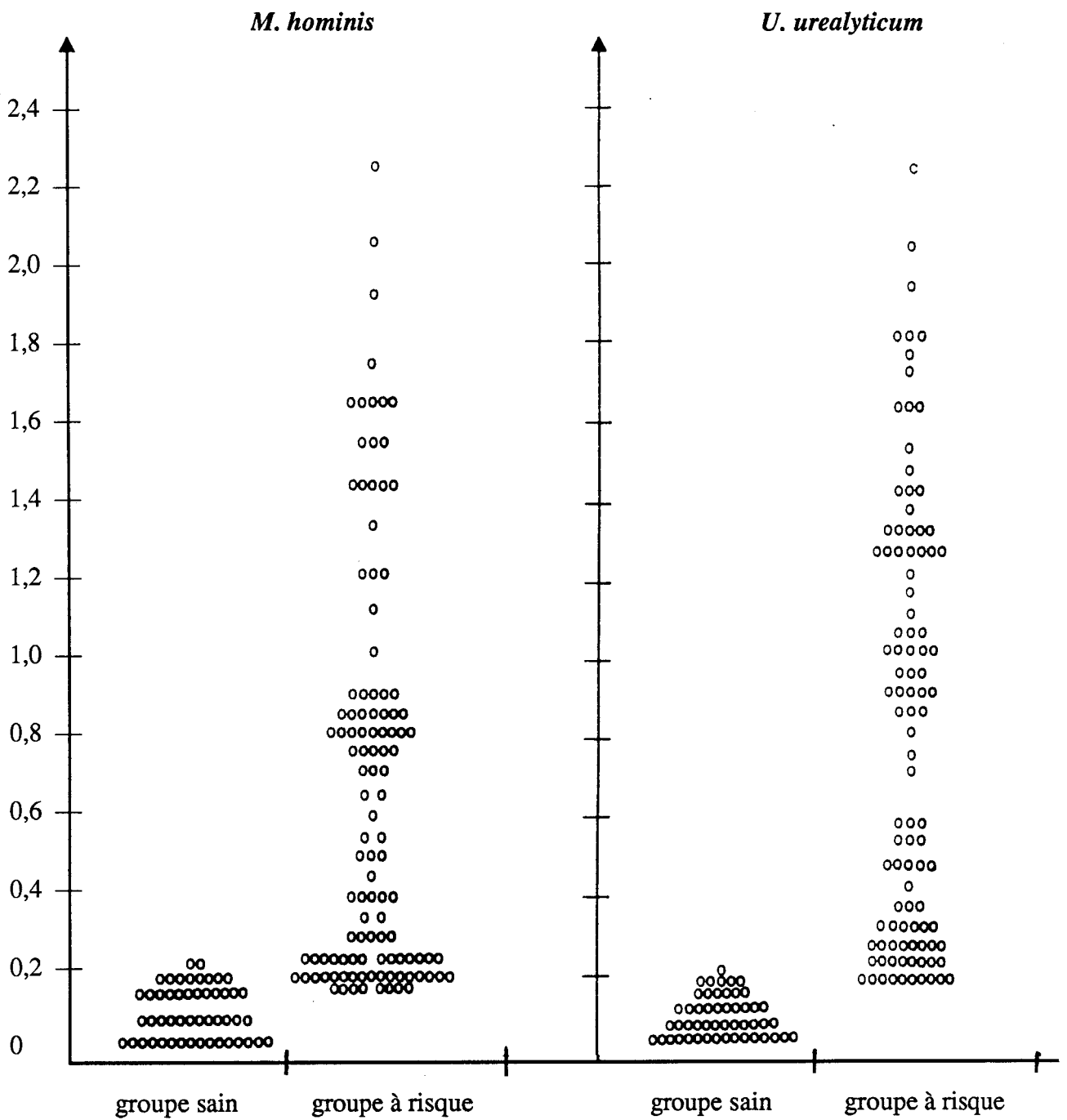


Figure 18 : Valeurs des densités optiques en ELISA-IgG pour les 2 groupes de patients

IV DIAGNOSTIC DIRECT

1) Introduction

Afin de pallier à la lourdeur et aux difficultés que présente l'isolement en culture, nous avons mis au point une méthode rapide d'identification des mycoplasmes à partir de produits pathologiques. Nous avons choisi l'Immunobinding Assay (IBA) qui est un test immunoenzymatique sur feuille de nitrocellulose en utilisant comme anticorps des immunoglobulines de souris spécifiques de l'espèce étudiée. Ce test possède un caractère qualitatif et non quantitatif.

2) Spécificité de la méthode

Celle-ci est déterminée en utilisant 6 mycoplasma et 8 ureaplasma comme antigène. Les anticorps de souris anti *M. hominis* PG 21 et anti *U. urealyticum* montrent des réactions positives avec leurs homologues; de plus, aucune réaction non spécifique n'est observée.

3) Sensibilité de la méthode

Afin de déterminer la sensibilité de la méthode, on applique 10 dilutions du milieu de culture titrant 10^8 colonies/ml sur la feuille de nitrocellulose. Le seuil de sensibilité de la technique s'avère être de $5 \cdot 10^3$ colonies/ml.

4) Identification de mycoplasme dans les prélèvements urogénitaux

Des taches pourpres sont apparues, dénotant une réaction immunologique, ceci uniquement avec les prélèvements vaginaux contenant les germes étudiés. Aucune réactivité n'est révélée lors de l'utilisation de prélèvements négatifs.

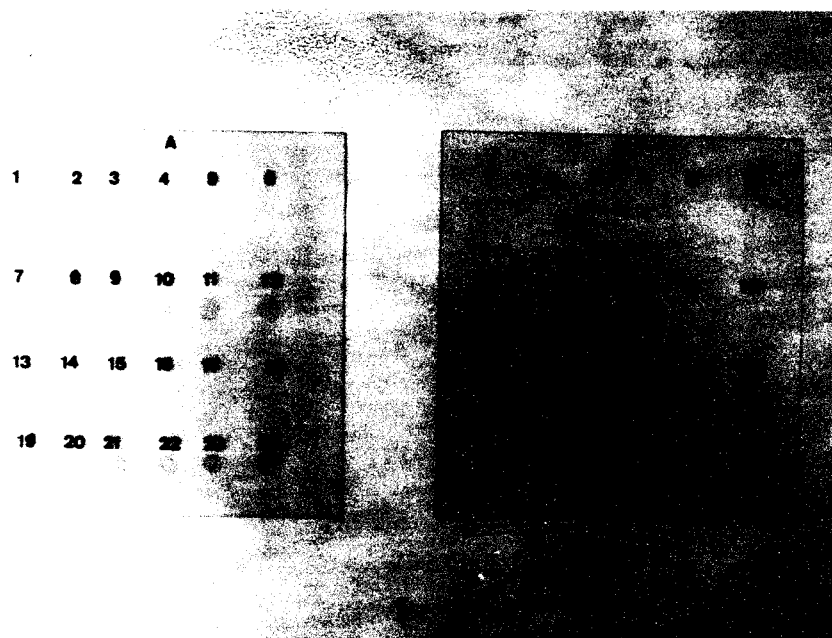


Figure 19 :

Test IBA sur des prélèvements vaginaux utilisant des anticorps polyclonaux anti *M. hominis* (A) et anti *U. urealyticum* (B). Les prélèvements 1 à 6 sont négatifs en culture, 7 à 12 positifs pour *M. hominis*, 13 à 18 positifs pour *U. urealyticum* et 19 à 24 positifs en *M. hominis* et *U. urealyticum*.

DISCUSSION

Au contraire des autres procaryotes, les mycoplasmes ne possèdent ni paroi ni structures membranaires intracellulaires. L'existence d'un seul type membranaire permet d'obtenir avec facilité la membrane plasmique sans risque de contamination par d'autres types membranaires. Certains mycoplasmes nécessitent seulement des techniques douces telles que la lyse osmotique pour séparer les membranes du cytoplasme, d'autres par contre requièrent des mesures plus drastiques pour la lyse cellulaire. En ce qui concerne *M. hominis* et *U. urealyticum*, plusieurs types de lyse ont été testés par nos soins : la lyse osmotique, alcaline et par les ultrasons. Cette dernière fournit les meilleurs résultats.

Le problème essentiel posé par l'obtention d'antigènes protéiques membranaires des mycoplasmes, réside dans le caractère hydrophobe de la majorité des protéines, leur solubilisation nécessitant alors l'intervention de solvants organiques ou de détergents. Notre étude préliminaire, utilisant des solvants organiques comme le n-butanol, phénol ou l'acétone pour solubiliser les protéines membranaires n'a pas été couronnée de succès. Nos efforts se sont donc alors concentrés sur les détergents. Ces derniers, de nature fortement ionique tels que le SDS et le CTAB, se sont montrés efficaces pour solubiliser les composants membranaires des mycoplasmes (95 % et 93 % de solubilisation), mais ils sont responsables d'une dénaturation plus importante des protéines membranaires, comme le montre la baisse de l'antigénicité observée en immunoélectrodifusion de Laurell. Celle-ci peut être imputée à un changement conformationnel dans les structures secondaires ou tertiaires des protéines ou à une perturbation de l'association lipide/protéine, ayant pour conséquence une modification du site biologique. D'autre part, il faut considérer le fait que les détergents utilisés, de nature anionique, cationique, zwitterion ou non ioniques, influent sur la migration électrophorétique des protéines ainsi traitées. Le déoxycholate de sodium apparaît occuper une position intermédiaire (80 % de solubilisation) entre les détergents fortement ioniques, les détergents non ioniques (NP-40) ou zwitterion (CHAPS). Avec le DOC, un pourcentage de solubilisation acceptable est obtenu avec une bonne conservation de l'activité antigénique.

L'utilisation d'un antigène membranaire soluble semble plus intéressante que celle d'un antigène membranaire brut, ceci pour deux raisons : une plus grande facilité d'utilisation, notamment pour sa solubilisation dans le tampon de fixation et une meilleure conservation due à une plus grande stabilité.

En ce qui concerne *M. hominis*, l'existence de réactions croisées entre les espèces du groupe Mycoplasma, nous a amené à préparer un antigène protéique soluble plus spécifique. Une procédure d'électroélution est choisie en regard du caractère hydrophobe des protéines et la possibilité d'utiliser une méthode simple et reproductible. En une seule étape, on obtient 10 mg de protéines électroéluées avec un rendement acceptable de 71 %. Malgré la présence de SDS, l'éluat reste antigéniquement actif par rapport à l'antigène solubilisé par le SDS. La quantité de SDS dans l'électroéluat est de 0,1 % alors qu'elle est de 2 % dans l'antigène membranaire soluble; ce fait expliquerait la différence d'antigénicité constatée entre ces deux extraits.

Le principal avantage présenté par la méthode ELISA sur la culture bactérienne est de permettre l'obtention des résultats en 3 heures, avec seulement 20 µl de sérum, au lieu de 3 jours à 1 semaine. Malgré l'élimination des faibles réactions croisées existantes au sein du groupe mycoplasma par l'antigène électroélué, l'antigène membranaire soluble lui est préféré pour les raisons suivantes : un prix de revient plus attractif, la difficulté d'extrapolation au niveau industriel du système d'électroélution, une sensibilité trop faible avec l'électroéluat (0,9 en D.O. contre 1,8 pour l'antigène soluble) et enfin une meilleure reproductibilité et homogénéité dans la répartition des antigènes, leur fixation et leur stabilité dans les plaques *M. hominis* et *U. urealyticum*. Pour pallier à l'interférence de réaction au sein du groupe mycoplasma, concernant particulièrement *M. hominis* et *M. pneumoniae* qui sont les espèces fréquemment étudiées en sérologie de routine, il est nécessaire de se fixer une valeur seuil assez élevée. En l'occurrence, dans notre cas, celle-ci est représentée par un seuil de densité optique de 0,4. On détecte les anticorps de classe IgG anti *U. urealyticum* avec une sensibilité de 93 % et anti *M. hominis* avec une sensibilité de 95 %.

Les résultats discordants que l'on observe lorsque la culture est positive et la sérologie négative peuvent s'expliquer par l'aspect récent de l'infection (la réponse immune n'est pas encore décelable) ou sa faible intensité ($< 10^4$ colonies/ml). De même, une culture négative associée à une sérologie positive peut correspondre à une infection ancienne guérie avec séquelle sérologique.

Ces résultats préliminaires déterminés avec un seuil de densité optique de 0,4 mériteraient d'être affinés sur un plus grand nombre de sérums, notamment de sujets "symptomatiques" (salpingite pour *M. hominis* ou uréthrite pour *U. urealyticum*). Depuis Janvier 1988, cette méthodologie est utilisée régulièrement en routine pour le diagnostic des mycoplasmoses urogénitales avec une bonne reproductibilité pour les mycoplasmes urogénitaux.

L'I_BA s'est avérée être une méthode d'identification rapide et sûre. Elle permet l'identification des mycoplasmes en 3/4 heures avec une bonne spécificité et sensibilité et avec un seuil de détection minimale de $5 \cdot 10^3$ colonies/ml, seuil correspondant à la concentration retenue en pathologie humaine. L'I_BA peut être utilisée indépendamment de l'âge des cultures ou de la viabilité des cellules, ce qui représente un avantage important. Nos essais ont porté sur des prélèvements pathologiques; mais l'I_BA peut être appliquée également à l'identification des mycoplasmes dans les cultures cellulaires. La concentration en mycoplasmes dans les surnageants de culture de cellules infectées étant habituellement de 10^7 à 10^8 colonies/ml, par rapport au seuil de détection déterminé dans notre étude, la détection des mycoplasmes par ce test se révèle très fiable.

CONCLUSION

Ce travail a permis d'améliorer le diagnostic biologique des infections à *M. hominis* et *U. urealyticum* par la mise au point de deux tests immunoenzymatiques :

- un test Enzyme Linked Immunosorbent Assay permettant un diagnostic indirect.
- un test Immunobinding Assay permettant un diagnostic direct de l'infection et une identification des espèces.

Par ELISA, des anticorps de classe IgG anti *U. urealyticum* et anti *M. hominis* ont été mis en évidence chez 57 % des sujets étudiés avec de très bonnes spécificités et une sensibilité de 95 %.

L'IBA s'est révélée être une méthode d'une grande sensibilité ayant permis de détecter spécifiquement les mycoplasmes recherchés dans divers prélèvements et qui est vouée à de grands développements économiques.

ANNEXE TECHNIQUE

MILIEU SP-4 DE TULLY (78)**I REACTIFS**

- Mycoplasma broth base (Difco)
- Tryptone (Difco)
- Rouge de Phénol (Merck)
- Sérum de cheval (Flow)
- CMRL-1066 (10 x) contenant de la glutamine (Gibco)
- Extrait de levure (Difco) préparé à 25 % dans de l'eau distillée puis autoclavé 15 minutes à +120°C
- Arginine (Sigma) préparée à 10 % dans de l'eau distillée puis filtrée sur filtre 0,45 µ (millipore)
- Pénicilline G préparée à 100 000 Unités/ml et filtrée sur filtre 0,45 µ (millipore)

II MILIEU LIQUIDE

Milieu de base :

Mycoplasma broth base	2,5	%
Tryptone	1,0	%
Rouge de phénol	0,002	%
Eau distillée	qsp	100 %

- le pH est ajusté à 7 avec NaOH 2N
- le milieu est autoclavé 15 minutes à + 120°C

Milieu complet

Milieu de base	58	%
Sérum de cheval	10	%
CMRL-1066 (10 x)	20	%
Extrait de levure à 25 %	10	%
Arginine à 10 %	2	%
Pénicilline G à 100 000 Unités/ml..	0,5	%

III MILIEU SOLIDE

Celui-ci est obtenu par addition de 1,4 % d'agar noble (Difco) dans le milieu de base. Après avoir été autoclavé, le milieu est placé dans un bain marie à + 56°C. Les compléments stériles sont ajoutés et le milieu est immédiatement coulé dans des boîtes de Pétri.

MILIEU 10-C DE SHEPARD (66)**I REACTIFS**

- PPLO broth W/OCV (Difco)
- Rouge de Phénol (Merck)
- Sérum de cheval (Flow)
- C.V.A. enrichment (Gibco)
- Extrait de levure (Difco) préparé à 25 % dans de l'eau distillée puis autoclavé 15 minutes à + 120°C, l'extrait est conservé à - 20°C.
- L. Cystéine (Sigma) préparée à 10 % dans de l'eau distillée et filtrée sur filtre 0,45 µ (millipore)
- Urée (Difco) préparée à 10 % dans de l'eau distillée et filtrée sur filtre 0,45 µ (millipore)
- Pénicilline G préparée à 100 000 Unités/ml et filtrée sur filtre 0,45 µ (millipore)

II MILIEU LIQUIDE

Milieu de base :

PPLO broth W/OCV	1,6	%
Rouge de phénol	0,002	%
Eau distillée	qsp	100 %

- le pH est ajusté à 5,5 avec HCl 2N
- le milieu est autoclavé 15 minutes à + 120°C

Milieu complet

Milieu de base	78	%
Sérum de cheval	10	%
C.V.A. enrichment	20	%
Extrait de levure à 25 %	10	%
L. Cystéine à 10 %	2	%
Urée à 10 %	1	%
Pénicilline G à 100 000 Unités/ml..	0,5	%

III MILIEU SOLIDE

Celui-ci est obtenu par addition de 1,4 % d'agar noble (Difco) dans le milieu de base. Après avoir été autoclavé, le milieu est placé dans un bain marie à + 56°C. Les compléments stériles sont ajoutés puis le milieu est immédiatement coulé dans des boîtes de Pétri.

DOSAGE DES PROTEINES

SELON LA METHODE DE MARKWELL *ET AL.* (40)

I PRINCIPE

C'est celui de la méthode de Lowry. Il repose sur la réduction des acides phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin, en présence du complexe formé en milieu alcalin entre les ions Cu^{2+} et les groupements tyrosine et tryptophane des protéines. Il se développe une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de protéines. L'absorbance est mesurée à 660 nm. La différence réside dans la présence du sodium dodécyl sulfate qui permet la solubilisation des protéines membranaires et donc une légère modification des réactifs.

II REACTIFS

1) Solution A

Solution de Na_2CO_3 à 2 % (P/V) dans la soude 0,1 M, contenant 0,16 % (P/V) de tartrate double de Na et de K et 1 % de SDS.

2) Solution B

Solution de $\text{Cu SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$ à 4 % (P/V) dans de l'eau distillée.

3) Solution C

Solution de travail préparée par un mélange de 100 volumes de solution A et 1 volume de solution B. Elle se conserve une journée.

4) Réactif de Folin Ciocalteu (Merck)

A diluer au 1/2 avec de l'eau bidistillée.

5) Etalons de sérum albumine bovine (Sigma Chemical Co)

Une gamme d'étalonnage de 10 à 200 μg de sérum albumine bovine/ml est réalisée par dilution dans de l'eau distillée d'une solution mère de sérum albumine bovine titrant 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

III MODE OPERATOIRE

Dans un tube à hémolyse propre, introduire 1 ml de la solution à doser et 3 ml de la solution C. Agiter et laisser 10 minutes au moins à température ambiante.

Ajouter ensuite 300 µl de réactif de Folin-Ciocalteu et mélanger immédiatement.

La coloration bleue se développe en 45 minutes à l'obscurité. L'absorbance de la solution est mesurée à 660 nm.

IV RESULTATS

Une droite d'étalonnage $C = kA$ ($A =$ absorbance, $C =$ concentration) permet de relier directement l'absorbance d'une solution à son taux de protéines exprimé en µg/ml.

**PREPARATION DES GELS D'ACRYLAMIDE
POUR PAGE-SDS DISCONTINUE**

I REACTIFS

1) Support des gels

Les supports des gels sont des plaques de verre de 18 cm x 16 cm que l'on fixe avec des montants et vis (Hoeffer scientific Instruments). L'épaisseur des gels correspond à l'épaisseur des séparateurs que l'on introduit entre deux plaques de verre (épaisseur de verre de 0,75 à 60 mm). Les plaques de verres doivent être parfaitement propres avant usage (lavage à l'acide, rinçage à l'eau distillée).

2) Solution stock d'acrylamide T = 30,8 % ; C = 2,7 %

H ₂ O distillée	200 ml
Acrylamide	60 g
N, N' méthylène bisacrylamide	1,6 g

Cette solution doit être conservée à + 4°C à l'abri de la lumière et toujours être filtrée avant utilisation. Il est vivement conseillé de faire cette solution toutes les semaines car il se forme de l'acide acrylique et le réseau du gel peut s'en trouver modifié.

3) Solution stock pour le gel de concentration

H ₂ O distillée	100 ml
Tris	6,06 g (0,5 M)

pH ajusté à 6,8 avec HCl

4) Solution stock pour le gel de séparation

H ₂ O distillée	100 ml
Tris	36,3 g (3 M)

pH ajusté à 8,8 avec HCl

Les solutions stocks sont filtrées et conservées à + 4°C.

5) Solution aqueuse à 10 % de Sodium dodécyl sulfate

6) Solution aqueuse à 2 % d'ammonium persulfate

Cette solution est à préparer extemporanément. L'ammonium persulfate en poudre doit être stocké en milieu sec et à l'abri de la lumière.

7) N, N, N', N' - tétraméthylène diamine (TEMED)

Ce produit doit être stocké à + 4°C.

II MODE OPERATOIRE

Avant le coulage des gels, tous les réactifs doivent être ramenés à température du laboratoire.

1) Mise en place des plaques de verre

Une fois les plaques de verre montées sur le support adéquat, nous délimitons avec un marqueur le niveau supérieur du gel de séparation.

2) Coulage du gel de séparation

Le tableau A donne les volumes de solution à utiliser pour des gels à des concentrations d'acrylamide différentes.

Tableau A : Composition des gels de séparation (Composition donnée pour obtenir 30 ml de gel). Il faut compter environ 30 ml de gel pour 1,5 mm d'épaisseur (gel de séparation sur une hauteur approximative de 11 cm).

Concentration en acrylamide	7 %	10 %	15 %
Solution stock acrylamide	7 ml	10 ml	15 ml
Solution stock pour le gel de séparation	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Solution aqueuse à 10 % SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
H ₂ O distillée	17,42 ml	14,42 ml	9,42 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Après avoir dégazé les solutions, nous ajoutons 1,5 ml de solution aqueuse à 2 % d'ammonium persulfate aux 30 ml de gel et nous versons immédiatement cette solution entre les plaques de verre avec une seringue ou une pipette Pasteur.

Un peu de solution d'isobutanol à 50 % est déposée, avec précaution et en évitant tout mélange, au-dessus de la solution de gel pour empêcher la formation d'un ménisque lors de la polymérisation. Il est possible de conserver ces gels de séparation plusieurs jours à +4°C. Dans ce cas, l'isobutanol est éliminé après polymérisation du gel par absorption sur papier filtre et remplacé par une solution de conservation. Cette solution de conservation a les mêmes caractéristiques ioniques et le même pH que le gel de séparation.

3) Coulage du gel de concentration

Le tableau B donne les volumes de solution à utiliser pour un gel de concentration à 4 %

Tableau B : Composition du gel de concentration

Solution stock acrylamide	1,6 ml
Solution stock pour le gel de concentration	2,5 ml
Solution aqueuse à 10 % SDS	0,1 ml
Eau distillée	7,29 ml
TEMED	10 μ l

Après dégazage de la solution de gel, 500 μ l de solution aqueuse à 2 % d'ammonium persulfate sont ajoutés et le gel de concentration est versé à l'aide d'une pipette Pasteur. Le peigne est introduit délicatement afin d'éviter la formation de bulles en bas des puits. Après polymérisation, le peigne est retiré et le gel est fixé dans la cuve d'électrophorèse.

PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR PAGE-SDS DISCONTINUE

Les échantillons subissent une action combinée du SDS, du 2 β mercapto-éthanol et de la chaleur avant la séparation électrophorétique.

I ECHANTILLONS MEMBRANAIRES ET CELLULAIRES

L'échantillon est mélangé volume à volume avec le tampon échantillon concentré 2 X et porté à ébullition pendant 5 minutes. Il est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 13 000 g (microfuge 11, Beckman, USA) afin d'éliminer les résidus non dissouts.

Tampon échantillon concentré 2 X : 0,125 M Tris
4 % SDS, 20 % glycérol
10 % 2 β mercapto-éthanol
0,002 % bleu de bromophénol
pH 6,8

Solution stock de gel de concentration	2,5 ml
Solution aqueuse à 10 % SDS	4 ml
2 β mercapto-éthanol	1 ml
Glycérol	2 ml
Bleu de Bromophénol	0,2 mg
H ₂ O	qsp 10 ml

La solution est divisée en aliquots et stockée au congélateur. Ensuite, les échantillons sont déposés délicatement dans les puits (chambre supérieure remplie de tampon de migration) à l'aide d'une seringue. Pour chaque type de peigne et de puits, une quantité de protéines à déposer est préconisée par Hoeffler Scientific Instruments.

II PROTEINES LYOPHILISEES MARQUEURS DE POIDS MOLECULAIRE

Les protéines lyophilisées de masse moléculaire connue précolorées ou non sont préparées selon un protocole préconisé par le fabricant (Sigma Chemical Company). Une fois préparées, ces solutions sont aliquotées et stockées au congélateur. Lors de l'utilisation, il suffit de décongeler ces protéines et de les porter à ébullition pendant 5 minutes avant de déposer.

Les protéines Sigma de masse moléculaire connue lyophilisées et utilisées dans nos travaux sont les suivantes.

<u>Protéines précolorées</u>	<u>Poids moléculaire</u>
2 macroglobuline	180 kD
β galactosidase	116 kD
Fructose-6-phosphate kinase	84 kD
Pyruvate kinase	58 kD
Fumarase	48,5 kD
Lactate déshydrogénase	36,5 kD
Triosephosphate isomerase.....	26,6 kD

PAGE-SDS DISCONTINUE :
MIGRATION ELECTROPHORETIQUE ET COLORATIONS

I MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

Nous utilisons le tampon de migration :

Tris	0,025 M
Glycine	0,192 M
SDS	0,1 %
pH 8,3 ajusté avec HCl 10 N	

Ce tampon se conserve à + 4°C et peut être utilisé 2 à 3 fois. Il est néanmoins conseillé de jeter le tampon supérieur après chaque migration électrophorétique.

Pour un gel présentant une épaisseur de 1,5 mm, un courant constant de 40 mA est appliqué pendant 1 heure au terme de laquelle le bleu de bromophénol se situe à l'interface entre le gel de concentration et le gel de séparation. A ce moment précis, nous augmentons l'intensité à 60 mA et au bout de 2 h à 2 h 30 environ, le bleu de bromophénol arrive à 0,5 cm de l'extrémité inférieure de la plaque.

II COLORATION DES PROTEINES

Après démoulage, les gels sont immergés pendant 2 à 3 heures dans la solution suivante :

250	ml de méthanol
50	ml d'acide acétique
200	ml d'eau bidistillée
1,25	g de Coomassie Brilliant Blue R250.

Le colorant est stocké à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire. La décoloration s'effectue par simple diffusion dans la solution de décoloration par une légère agitation.

Solution de décoloration :	500	ml de méthanol
	150	ml d'acide acétique
	1350	ml d'eau bidistillée

**COMPOSITION DES GELS DE SUPPORT
POUR L'ELECTROELUTION**

Tableau C : Composition des gels de support pour l'électroéluion

(quantités données pour obtenir 10 ml de gel)

	Gel de concentration pH 6,8
Solution stock acrylamide	2 ml
solution stock pour le gel	de concentration 2,5 ml
Solution aqueuse à 10 % SDS	0,1 ml
Eau distillée	6,9 ml
TEMED	10 μ l
A.P. 2 %	0,5 ml

INTRODUCTION

La technique de "Western blotting" a été introduite pour la première fois par Towbin et al (77). La combinaison du pouvoir de séparation de l'électrophorèse utilisant le système tampon discontinue de Laemmli (30) et la grande sensibilité de l'immunodétection a produit un outil très performant de l'étude du couple antigène-anticorps.

Le protocole comporte trois étapes :

- 1) L'extrait protéique est résolu par électrophorèse sur gel d'acrylamide (cf annexe technique précédente)
- 2) Les protéines ainsi séparées sont transférées électrophorétiquement sur une membrane de nitrocellulose
- 3) Les antigènes sont révélés par une technique immunoenzymologique.

I TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE

- Une demi-heure avant l'arrêt du gel de séparation, mettre une feuille de nitrocellulose (type BA 85, Schleicher et Schuell, Kassel, RFA) à tremper dans le tampon de transfert (25 mM tris-193 mM glycine, 0,07 % SDS, 20 % méthanol pH 8,3). Faire tremper également 6 feuilles de papier filtre (Whatman n° 3) dans le tampon de transfert.
- Démouler le gel SDS-PAGE en le laissant sur l'une des plaques de verre.
- Saturer le graphite de l'anode (système Multiphor II, Nova blot : LKD) avec du tampon de transfert.
- Placer 3 feuilles de papier filtre sur l'anode, puis la membrane de transfert, le gel et à nouveau 3 feuilles de papier filtre (le port de gant est recommandé pendant toute l'opération). Le "sandwich" est complété par la cathode, préalablement saturée par du tampon de transfert.
- Pour le "Nova blot", le transfert s'effectue pendant 50 à 60 minutes à raison de 0,8 mA/cm². Pour obtenir un transfert maximal il faut que, papiers filtres, membrane et gel soient de la même taille.

II REVELATION DES PROTEINES TRANSFEREES

- La membrane est rincée avec de l'eau distillée, puis les sites non occupés sont bloqués par incubation de la feuille 30 minutes sous agitation à température ambiante par du PBS contenant 5 % de lait écrémé en poudre.
- La membrane est ensuite incubée avec le sérum à tester dilué dans le PBS-lait. Les sérums prélevés sur des animaux immunisés sont utilisés à des dilutions variant de 1/200ème à 1/1000ème. L'incubation s'effectue pendant une nuit à + 4°C.
- La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 10 minutes à température ambiante avec du PBS-Tween.
- L'immunodétection est conduite en utilisant un anticorps conjugué à la peroxydase contre les anticorps totaux de l'espèce, source du premier sérum. Le conjugué que nous avons utilisé est un anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase et dilué au 1/8000ème dans le PBS-Tween et incubé 1 heure sous agitation et à température ambiante.
- Après 3 bains de 10 minutes dans le PBS-Tween, la membrane est ensuite rincée une fois pendant 5 minutes dans le PBS.
- Le substrat est le 3,3'- diaminobenzidine (DAB) (Sigma) utilisé à 0,04 % dans le PBS. Une solution d'H₂O₂ (30 % par volume : 1 µl pour 1 ml de solution) est ajoutée juste avant l'utilisation. La réaction est pratiquement instantanée et pour éviter une trop forte coloration de la feuille de nitrocellulose, la réaction est stoppée en retirant la solution de révélation et en lavant la membrane trois fois dans l'eau distillée.

IMMUNOELECTRODIFFUSION QUANTITATIVE

METHODE DE LAURELL (32)

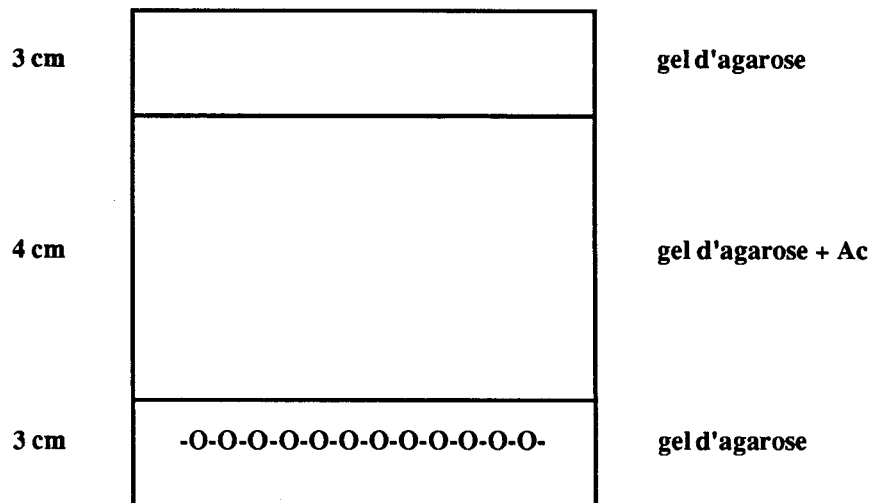
INTRODUCTION

Cette technique a pour principe la formation de complexes immuns précipitants entre des structures à caractères immunogènes (protéines) et des immunoglobulines dirigées contre elles. Elle consiste en une migration électrophorétique des antigènes protéiques sur un gel d'agarose contenant des anticorps qui induisent la précipitation. Il en résulte des pics ou "rocket", l'aire de ces pics est directement proportionnelle à la concentration en antigène et inversement proportionnelle à la concentration en anticorps. C'est une méthode essentiellement quantitative.

PREPARATION DES GELS

Une solution d'agarose à 1 % (p/v) est préparée en solution tris-glycine (T/G) en portant le mélange à ébullition et en évitant l'évaporation. La solution est alors placée dans un bain-marie maintenu à 56°C. A l'aide d'une pipette à écoulement rapide, l'agarose est prélevé et déposé rapidement par simple écoulement au centre de la plaque (100 mm x 100 mm x 1 mm) de façon à ce que l'on obtienne une couche de 1,5 mm d'épaisseur.

Après une minute, le gel est solidifié et l'on peut percer les puits (diamètre : 1 mm) avec l'emporte-pièce à 1 cm au bord de la plaque.



En s'aidant du modèle de la page précédente, le gel est découpé sur 4 cm à 3 cm des 2 bords de la plaque et enlevé. Le gel d'agarose contenant les anticorps est préparé dans un tube de verre propre, placé préalablement au bain-marie, en mélangeant la solution d'agarose et la solution d'anticorps, pour un volume total de 3,5 ml à raison de 20 % d'anticorps (500 µg d'IgG par cm²) (v/v). Le mélange homogénéisé est rapidement déposé.

ELECTROPHORESE

La plaque est disposée dans la cuve à électrophorèse. Afin d'éviter leur diffusion dans le gel, les échantillons doivent être déposés dans les puits au dernier moment. La quantité de protéines à déposer est de 15-20 µg dans le cas de protéines des membranes plasmiques. Le volume d'un puits est de 15 µl. Après avoir déposé les échantillons et des ponts de papier Whatman, une tension de 6 volts/cm est appliquée pendant 2 heures. Après électrophorèse, le gel est lavé, séché et coloré.

Le lavage

En tampon salin 24 heures, puis 2 bains d'eau distillée dans les 24 heures suivantes.

Le séchage

Sous un courant d'air chaud

La coloration

Par le bleu de Coomassie R 250 0,5 % dans le tampon 10 % acide acétique - 45 % éthanol - 45 % d'eau

REFERENCES

1. **AJELLO F.**, N. Romano and M.F. Massenti
L. histidine amonia lyase from a T-strain mycoplasma (Ureaplasma).
Boll. Ist. Sicroter Milan, 1977, **56**, 343-350.
2. **AMAR A.**, S. Rottem, I. Kahane and S. Razin
Characterization of the mycoplasma membrane protein. Composition and disposition of proteins
in membranes from aging *Mycoplasma hominis* culture.
Biochem. Biophys. Acta., 1976, **426**, 258-270.
3. **ANDERSEN H.**, S. Birkelund, G. Christiansen, and E.A. Freundt
Electrophoretic analysis of proteins from *Mycoplasma hominis* strains detected by SDS-PAGE,
two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting.
J. Gen. Microbiol., 1987, **133**, 181-191
4. **ANDERSON D.R.** and M.F. Barille
Ultrastructure of *Mycoplasma Hominis*.
J. Bacteriol., 1965, **90**, 180-192
5. **ARCHIBALD R.M.**
Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma.
J. Biol. Chem., 1944, **156**, 121-124
6. **BAK A.**, F.T. Black, C. Christiansen, and E.A. Freundt
Cenome size of Mycoplasmal DNA
Nature, 1969, **224**, 1209-1210
7. **BERCOVICI B.**, H. Haas, T. Sacks and A. Laufer
Isolation of Mycoplasmas from the genital tract of women with reproductive failure, sterility
or vaginitis.
Israel J. Med. Sci., 1978, **14**, 347-352
8. **BLENK A.**, R. Arndt and B. Blenk
Abstract p46. Fourth meeting of the international organization of Mycoplasmology.
Tokyo, 1982
9. **BREDT W.**, H.H. Heunert, K.H. Höfling and B. Milthaler
Microcinematographic studies of *Mycoplasma hominis* cells.
J. Bacteriol., 1973, **113**, 1223-1227

10. **BROWN M.B., G.H. Cassell, D. Taylor-Robinson and M.C. Shepard**
Measurement of antibody to *Ureaplasma urealyticum* by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and detection of antibody responses in patients with non gonococcal urethritis.
J. Clin. Microbiol., 1983, **17**, 288-295
11. **BROWN M.B., C. Minion, J.K. Davis, D.G. Pritchard and G.H. Cassell**
Antigens of *Mycoplasma hominis*.
Sex. Transm. Dis., 1983, **10**, 247-255
12. **BROWN M.B., G.H. Cassell, W.M. Mc Cormack and J.K. Davis,**
Measurement of antibody to *Mycoplasma hominis* by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and detection of class-specific antibody responses in women with post partum fever.
Am. J. Obstet. Gynecol., 1987, **156**, 701-708
13. **BRUNELL P.A., R.M. Dische and M.B. Walker**
Mycoplasma, amniotitis and respiratory distress syndrome.
JAMA, 1969, **207**, 2097-2099
14. **CASSELL G.H., H.L. Watson, D.K. Blalock, S.A. Horowitz and L.B. Duffy**
Protein antigens of genital mycoplasmas.
Rev. Infect. Dis., 1988, **10**, 391-398
15. **CHANOCK R., L. Hayflick and M.F. Barile**
Growth on artificial medium of an agent associated with a typical pneumoniae and its identification. Proc. Nat. Acad. Sci., 1962, **48**, 41-43
16. **CORBEIL L.B., C.E. Hall, D. Lein, R.R. Corbeil and R. Duncan**
Immunoglobulin classes in genital secretions of Mycoplasma -infected and normal Heifers
Infect. Immun., 1976, **13**, 1595-1600
17. **DIENES L. and G. Edsall**
Observations on the L. organism of Klieneberger.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1937, **36**, 740-744
18. **FEUSKE I.D. and G.E. Kenny**
Role of arginine deiminase in growth of *Mycoplasma hominis*.
J. Bacteriol., 1976, **126**, 501-510

19. FREUNDT E.A.

The classification of the pleuropneumoniae group of organisms (Borreliomycetales).

International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 1955, **5**, 67-68

20. FREUNDT E.A.

Mycoplasma hominis : Historical outline and Taxonomy.

Sex. Trans. Dis., 1983, **10**, 226-229

21. GABRIDGE M.C., Y.D. Barden Stattel, R.B. Polisky and J.A. Engelhardt

Differences in the attachment of *M. pneumoniae* cells and membranes to tracheal epithelium.

Infect. Immun., 1977, **16**, 766-772

22. GEWITZ M, R. Dinwiddie, L. Rees, Volikaso, T. Muille, B. O'Connell and W.C. Marshall

Mycoplasma hominis : a cause of neonatal meningitis.

Arch. Dis. Child., 1979, **54**, 231-233

23. GIBBS R.S., G.H. Cassell, J.K. Davis, and P.J. St Clair

Further studies on genital mycoplasmas in intra-amniotic infection : blood cultures and serologic response.

AM. J. Obstret. Gynecol., 1986, **154**, 717-726

24. HOLLINGDALE M.R. and R.M. Lemcke

The antigens of *Mycoplasma hominis*.

J. Hyg. Camb., 1969, **67**, 585-602

25. HOLLINGDALE M.R. and R.M. Lemcke

Antigenic differences within the species of *Mycoplasma hominis*.

J. Hyg. Camb., 1970, **68**, 469-77

26. HORNE H.W., A.T. Hertig, R.B. Kundsinn and J. Kosasa

Subclinical endometrial inflammation and T-Mycoplasma : A possible cause of human reproductive failure.

Fertil. Steril., 1974, **25**, 380-389

27. JOHNSON J.D. and J. Horowitz

Characterization of ribosomes and RNAs from *Mycoplasma hominis*.

Biochem. Biophys. Acta., 1971, **247**, 262-79.

28. **KAHANE I.** and J.G. Tully
Binding of plant lectins to mycoplasma cells and membranes.
J. Bacteriol., 1976, **128**, 1-7
29. **KENNY G.E.** and G.L. Dunsmoor
Principles, problems and strategies in the use of antigenic mixtures for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.
J. Clin. Microbiol., 1983, **17**, 655-665
30. **KOTANI H.** and G.J. Mc Garrity
Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding
J. Immunol. Method., 1985, **85**, 257-268
31. **LAEMMLI U.K.**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 1970, **227**, 680-685
32. **LAURELL C.B.**
Antigen-antibody crossed electrophoresis
Anal. biochem., 1965, **10**, 358-362
33. **LEE Y.H., R.R. Nersasian, N.K. Lan, A. Mc Donald and W.M. Mc Cormack**
Wound infections with *Mycoplasma hominis*.
JAMA, 1971, **218**, 252-253
34. **LIEPMANN M.F., P. Watre, A. Dewilde, G. Papierok and M. Delecour**
Detection of antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using membrane antigen and investigation of the significance of the antibodies.
J. Clin. Microbiol., 1988, **26**, 2157-2160
35. **LIN J.S.** and E.H. Kass
Serological reactions of *Mycoplasma hominis* : differences among mycoplasmacidal antibody in human serum.
J. Immunol., 1972, **108**, 1491-1498

36. LIN J.S. and E.H. Kass

Serological reactions of *Mycoplasma hominis* : differences among mycoplasmacidal, metabolic inhibition, and growth agglutination tests.

Infect. Immunol., 1974, **10**, 535-54

37. MARDH P.A., L. Weshom, C. Von Mecklenburg and E. Hamman

Studies on ciliated epithelia of the human genital tract t. Swelling of the Cilia of Fallopian tube epithelium in organe culture infected with *Mycoplasma hominis*.

Br. J. Vener. Dis., 1976, **52**, 52-57

38. MARDH P.A, B.R. Moller and W.M. Mc Cormack

International symposium on *Mycoplasma hominis* a human pathogen.

Sex. Transm. Dis., 1983, **10** (suppl), 225-385

39. MARDH P.A

Mycoplasma hominis infection of the central nervous system in newborn infants.

Sex. Transm. Dis., 1983, **10** (suppl), 331-334

40. MARKWELL M.A., S.M. Haas, L.L. Bieber and N.E. Tolbert

A modification of the Lowry procedure to symplify protein determination in membrane and lipo-protein samples.

Anal. Biochem., 1978, **87**, 206-210

41. Mc DONALD M.I., J.O. Moore, J.M. Harrelson, C.P. Browing and H.A. Gallis

Septic arthritis due to *Mycoplasma hominis*.

Arthritis Rhum., 1983, **26**, 1044-1047

42. MIETTINEN A., J. Paavonen, E. Jansson and P. Leinikki

Enzyme immunoassay for serum antibody to *Mycoplasma hominis* in women with acute pelvic inflammatory disease.

Sex. Transm. Dis., 1983, **10**, 289-293

43. MOKHBAT J.E., P.K. Peterson, L.D. Sabath and J.A. Robertson

Peritonitis due to *Mycoplasma hominis* in a renal transplant recipient.

J. Infect. Dis., 1982, **146**, 713-715

44. **NAESSENS A., W. Foulon, H. Cammu, A. Goossens and S. Lauwers**
Epidemiology and Pathogenesis of *Ureaplasma urealyticum* in spontaneous abortion and early preterm labok.
Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 1987, **66**, 513-516
45. **NEIMARCK H.C.**
Division of Mycoplasmas into subgroups.
J. Gen. Microbiol., 1971, **63**, 249-263
46. **NICOL C.S. and D.G. Edward**
Role of organisms of the pleuropneumoniae group in human genital infection.
Br. J. Vener. Dis., 1953, **29**, 141-150
47. **PAYAN D.G., N. Sergal and S. Madoff**
Infection of a brain abscess by *Mycoplasma hominis*.
J. Clin. Microbiol., 1981, **14**, 571-573
48. **PIOT P.**
Comparisons of growth inhibition and immunofluorescence tests in serotyping clinical isolates of *Ureaplasma urealyticum*.
Br. J. Vener. Dis., 1977, **53**, 186-9
49. **POWELL D.A., K. Miller and W.A. Clyde**
Submandibular adenitis in a newborn infant caused by *Mycoplasma hominis*.
Pediatrics 1979, **63**, 798-799
50. **QUINN P.A., L.U. Arshoff and H.C.S. Li**
Serotyping of *Ureaplasma urealyticum* by immunoperoxidase assay.
J. Clin. Microbiol., 1981, **13**, 670-676
51. **RATNER S.**
Enzymatic synthesis of arginine (condensing and splitting enzymes).
In "Methods in Enzymology" (SP Colowick and N.V. Kaplan eds) Vol. 2 p. 356. Academic press
New York

52. RAZIN S.

The Mycoplasmas

Microbiol. Rev., 1978, **42**, 414-470

53. RAZIN S.

Membrane proteins

In: M.F. Barile, S. Razin eds. The Mycoplasmas. Vol. 1. New York Academic Press, 1979 :
289-322

54. RODWELL A.W., E.S. Rodwell and D.B. Archer

Mycoplasma lack a protein which closely resembles actin.

Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology letters, 1979, **5**, 235-
238

55. ROBERTSON J., M. Gormershall and P. Gill

Mycoplasma hominis : Growth reproduction, and isolation of small viable cells.

J. Bacteriol., 1975, **124**, 1007-1018

56. ROBERTSON J.A., M. Alfa and E. Boatman

Morphology of the cells and colonies of *Mycoplasma hominis*.

Sex. Trans. Dis., 1983, **10**, 232-235

57. ROTTEM S. and S. Razin

Isolation of Mycoplasma Membranes by digitonin.

J. Bacteriol. 1972, **110**, 699-705

58. ROTTEM S. and S. Razin

Membrane lipids of *Mycoplasma hominis*.

J. Bacteriol., 1973, **113**, 565-571

59. ROTTEM S.

Heterogeneity in the physical state of the exterior and interior region of Mycoplasma membrane lipids.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, **64**, 7-12

60. **ROTTEM S.** and A.S. Greenberg

Changes in composition, biosynthesis and physical state of membrane lipids occurring upon aging of *Mycoplasma hominis* cultures.

J. Bacteriol., 1975, **121**, 631-639

61. **RUDD P.T.**, M.B. Brown and G.H. Cassell

A prospective study of mycoplasma infection in the preterm infant.

Isr. J. Med. Sci., 1984, **20**, 899-901

62. **SASAKI T.**, C. Bonissol, B. Stoiljkovic and K. Ito

Demonstration of cross reactive antibodies to Mycoplasma in human sera by E.L.I.S.A. and immunoblotting.

Microbiol. Immunol., 1987, **31**, 639-648

63. **SHEPARD M.C.**

The recovery of pleuropneumonia-like organisms from negro with and without nongonococcal urethritis.

Amer. J. Syph. Gonorr. Vener. Dis., 1954, **38**, 113-124

64. **SHEPARD M.C.** and D.R. Howard

Identification of "T" mycoplasmas in primary agar cultures by means of a direct test for urease.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1970, **74**, 809-819

65. **SHEPARD M.C.**, C.D. Lunceford, D.K. Ford, R.H. Rucell, D. Taylor-Robinson, S. Razin and F.T. Black

Ureaplasma urealyticum gen. nov., sp. nov. : Proposed nomenclature for the human T (strain) mycoplasmas.

Int. J. Syst. Bacteriol., 1974, **24**, 160-171

66. **SHEPARD M.C.**

Culture Media for Ureaplasmas.

In : M.F. Barile and S. Razin eds. The Mycoplasmas. Vol. 1 New York Academic Press, 1979, p. 137-145

67. **SIMBERKOFF M.S.**, and B. Toharski
Mycoplasma in adult male patients.
JAMA, 1976, **236**, 2522-2524
68. **SMITH H.**
Microbial surfaces in relation to pathogenicity.
Bact. Rev., 1977, **41**, 475-500
69. **SOMERSON N.L.**, P.R. Reich, B.E. Walls, R.M. Chanock and S.M. Weissman
Genetic differentiation by nucleic acid homology.
J. Bacteriol. 1966, **92**, 311-317
70. **SPENCER R.C.** and C.B. Brown
Septicaemia in a renal transplant patient due to *M. hominis*.
J. Infect. Dis., 1983, **6**, 267-268
71. **STALHEIM O.H.V.** and J.E. Gallagher
Ureaplasma epithelial lesions related to amoniac.
Infect. Immunity., 1977, **15**, 995-996
72. **STEFFENS D.O.**, J.S. Dummer, M.S. Granick, A.W. Pasculle, B.P. Griffith and
G.H. Cassell
Sernotomy infections with *M. hominis*.
Ann. Intern. Med., 1987, **106**, 204-208
73. **SWENSON C.E.**, J.P. Banks and J. Schachter
Organ culture studies with *Mycoplasma hominis*.
Sex. Trans. Dis., 1983, **10**, 355-359
74. **TAYLOR-ROBINSON D.** and F.E. Carney
Growth and effect of Mycoplasmas in fallopian tube organ culture.
Br. J. Vener. Dis., 1974, **50**, 212-215
75. **TAYLOR-ROBINSON D.**, A.D., M. Mc William and D. Cormack
The Genital Mycoplasmas
The New England Journal First part 1980, **302** (18), 1003-1010
Second part 1980, **302** (19), 1063-1067

76. TAYLOR-ROBINSON D.

Mycoplasma infections of the human urogenital tract with particular reference to non gonococcal urethritis.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1984, **135 A**, 129-134

77. TOWBIN H., T. Staehelin and J. Gordon

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications.

Proc. Nat. Acad. Sci., 1979, **76**, 4350-4354

78. TULLY J.G., R.F. Whitcomb, H.F. Clark and D.L. Williamson

Pathogenic mycoplasmas : Cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma.

Science, 1977, **195**, 892-894.

79. TURUNEN H., P. Leinikki and E. Jansson

Serological characterization of *Ureaplasma urealyticum* strains by Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA).

J. Clin. Pathol., 1982, **35**, 439-443

80. VINTHER O.

Biochemistry of *Mycoplasma hominis*.

Sex. Trans. Dis., 1983, **10**, 244-246

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION GENERALE	14
I-HISTORIQUE	16
II-CLASSIFICATION	17
III-CARACTERES GENERAUX	18
A/ Morphologie	18
B/ Mode de reproduction	18
C/ Ultrastructure	18
1) La membrane plasmique	18
2) Le cytoplasme	21
IV-CARACTERES CULTURAUX ET METABOLIQUES	22
A/ Composition des milieux	22
B/ Facteurs influençant la croissance	23
C/ Propriétés biochimiques	24
1) <i>Mycoplasma hominis</i>	24
2) <i>Ureaplasma urealyticum</i>	25
V-ROLE DES MYCOPLASMES EN PATHOLOGIE URO-GENITALES	26
A/ Cause de la pathogénicité	26
B/ Immunité, défense de l'organisme contre l'infection	27
C/ Tableaux cliniques	27
1) <i>Mycoplasma hominis</i>	27
2) <i>Ureaplasma urealyticum</i>	27
VI-METHODES DE DIAGNOSTIC	28
A/ Diagnostic direct	28
1) Les prélèvements	28
2) Milieux pour prélèvement et conservation	28
3) Inoculation des prélèvements	28
4) Problèmes du diagnostic par isolement	30

B/ Diagnostic direct	30
MATERIEL ET METHODES	31
I-SOUCHES BACTERIENNES	32
II-SERUMS	32
III-PREPARATION DES ANTIGENES DE <i>MYCOPLASMA HOMIMNIS</i> ET <i>D'UREAPLASMA UREALYTICUM</i>	33
A/ Préparation des membranes cellulaires de <i>M.hominis</i> et d' <i>U.urealyticum</i>	33
1) Préparation de suspensions cellulaires	33
2) Obtention de membranes cellulaires	34
B/ Préparation d'antigènes membranaires solubles	34
C/ Préparation d'antigènes protéiques membranaires de <i>M.hominis</i> par électroélution	36
IV-PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-<i>M.HOMINIS</i> ET ANTI-<i>U.UREALYTICUM</i>	39
A/ Immunserum de lapin	39
B/ Immunoglobulines de souris	39
1) Anticorps spécifiques anti- <i>M.hominis</i>	39
2) Anticorps anti- <i>U.urealyticum</i>	39
3) Purification	40
V-APPLICATION AU DIAGNOSTIC	41
A/ Diagnostic indirect	41
1) Définition des paramètres de la réaction ELISA	41
2) Application au serum de lapin expérimental	41
3) Application aux serums humains: détection d'anticorps IgG	42
B/ Diagnostic direct	42
1) Spécificité des anticorps	43
2) Application aux prélèvements vaginaux	43

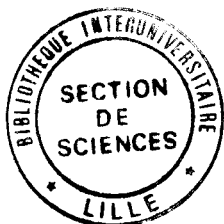
RESULATS	44
I-PREPARATION DES ANTIGENES	45
1) Introduction	45
2) La lyse	46
3) Solubilisation des membranes	46
4) Etude de l'antigénicité	48
5) Choix de l'antigène soluble	50
6) Electroélution	50
II-PREPARATION DES ANTICORPS	55
1) Introduction	55
2) Résultats de la purification des immunoglobulines de souris	55
III-DIAGNOSTIC INDIRECT	57
1) Introduction	57
2) Détermination de la dilution antigénique optimale	57
3) Sensibilité de la méthode	57
4) Spécificité de la méthode	58
5) Application sérologique	59
IV-DIAGNOSTIC DIRECT	64
1) Introduction	64
2) Spécificité de la méthode	64
3) Sensibilité de la méthode	64
4) Identification de mycoplasme dans les prélèvements urogénitaux	64
DISCUSSION	66
CONCLUSION	70

ANNEXE TECHNIQUE	72
- MILIEU SP-4 DE TULLY	73
- MILIEU 10-C DE SHEPARD	75
- DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE MARKWELL	77
- PREPARATION DES GELS D'ACRYLAMIDE POUR PAGE-SDS DISCONTINUE	83
- PAGE-SDS DISCONTINUE: MIGRATION ELECTROPHORETIQUE ET COLORATION	85
- COMPOSITION DES GELS DE SUPPORT POUR L'ELECTROELUTION	86
- WESTERN BLOT	87
- IMMUNOELECTRODIFFUSION QUANTITATIVE: METHODE DE LAURELL	89
REFERENCES	91
TABLE DES MATIERES	102
LISTE DES ILLUSTRATIONS	107

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Suspension cellulaire de mycoplasmes observée en microscopie électronique (grossissement 70 000).....	p. 19
Figure 2 : Colonies de <i>M. hominis</i> (grossissement 180).....	p. 29
Figure 3 : Colonies d' <i>U. urealyticum</i> (grossissement 180).....	p. 29
Figure 4 : Procédure de séparation des fractions cytoplasmiques et membranaires selon Hollingdale (24).....	p. 35
Figure 5 : Schéma de montage des tubes d'électroéluions.....	p. 38
Figure 6 : Taux d'anticorps chez 40 patientes infectées par <i>U. urealyticum</i> vis-à-vis des 8 sérotypes.....	p. 45
Figure 7 : Cinétique de la lyse de <i>Mycoplasma hominis</i> (.) et d' <i>Ureaplasma urealyticum</i> (*).	p. 47
Figure 8 : Etude de la solubilisation des membranes par détergents.....	p. 49
Tableau 1 : Récapitulatif sur la solubilisation des protéines membranaires.....	p. 50
Figure 9 : Pourcentage de protéines libérées dans le surnageant.....	p. 51
Figure 10 : Profils électrophorétiques des protéines membranaires solubles de <i>M. hominis</i> et d' <i>U. urealyticum</i>	p. 52

- Figure 11 :** Réactions d'immunoprécipitation électrophorétique d'un immunsérum de lapin anti-membranaires *M. hominis* (11a) et d'un immunsérum de lapin anti-membranaires *U. urealyticum* (11b) vis-à-vis de diverses préparations antigéniques..... p. 53
- Figure 12 :** Profil électrophorétique de l'électroéluat de *M. hominis*..... p. 54
- Figure 13 :** Réaction d'immunoprécipitation entre l'immunsérum de lapin anti-membranaires de *M. hominis* et l'électroéluat (3)..... p. 54
- Figure 14 :** Diagramme d'élution des immunsérums de souris sur DEAE Trisacryl (IBF)..... p. 56
- Figure 15 :** Valeurs des densités optiques de l'immunsérum de lapin anti-*U. urealyticum* (*) et anti-*M. hominis* (.) et du sérum normal (O), dilués au 1/10 000ème..... p. 60
- Figure 16 :** Valeurs des densités optiques pour une concentration antigénique de 5 µg/ml en fonction des dilutions sériques de lapin anti-*U. urealyticum* (*), anti-*M. hominis* (.) et du sérum normal (O)..... p. 61
- Figure 17 :** Valeurs des densités optiques en ELISA-IgG des pools de sérums de patients positifs en culture pour *U. urealyticum* (*), pour *M. hominis* (.) et des pools de sérums négatifs (O)..... p. 62
- Figure 18 :** Valeurs des densités optiques en ELISA-IgG pour les 2 groupes de patients. p. 63
- Figure 19 :** Test IBA sur des prélèvements vaginaux utilisant des anticorps polyclonaux anti-*M. hominis* (A) et anti-*U. urealyticum* (B)..... p. 65



Etant donné la latence et la chronicité de l'infection par les mycoplasmes uro-génitaux, *M. hominis* et *U. urealyticum*, leur évolution à bas bruit vers de lourdes séquelles, il nous a semblé nécessaire de disposer de techniques simples et reproductibles permettant un diagnostic rapide des infections par ces microorganismes. Pour pallier à la lourdeur et la difficulté de la culture, nous avons mis au point une méthode rapide d'identification des mycoplasmes à partir de produits pathologiques. Mais étant donné la fréquence des porteurs sains de mycoplasmes, l'identification du germe ne peut suffire à établir une relation de cause à effet entre le mycoplasme et le syndrome observé. Il est nécessaire de prouver son rôle antigénique en démontrant l'élaboration d'anticorps humoraux spécifiques. Dans cet objectif, nous avons développé un test immunologique pour la recherche d'anticorps.

Le test immunologique choisi est un Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Pour son élaboration, des membranes de *M. hominis* et d'*U. urealyticum* ont été obtenues après une lyse aux ultrasons suivie d'une centrifugation différentielle. Après avoir étudié plusieurs types de détergents, les antigènes membranaires sont solubilisés par du déoxycholate de sodium et leur antigénicité vérifiée. D'autre part, les protéines 102 et 116 kD spécifiques de *M. hominis* sont obtenues par élution électrophorétique; cet antigène est comparé à l'antigène membranaire soluble précédent. Les conditions optimales du test ELISA sont étudiées à l'aide d'un immunosérum de lapin anti *M. hominis* et/ou *U. urealyticum*. La méthodologie est appliquée au diagnostic chez 150 patients.

En ce qui concerne le test direct, l'Immunobinding Assay (IBA), des anticorps spécifiques des espèces étudiées sont préparés par immunisation des souris. Des immunoglobulines sont purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium des immunosérums de souris suivie d'une dialyse de trois jours et d'une chromatographie d'échangeurs d'ions. La spécificité du test est étudiée vis-à-vis de 5 mycoplasma et 8 ureaplasma. La technique est appliquée à l'étude de 20 prélèvements génitaux humains.