

Mycoplasma pneumoniae

Items de l'ECN concernés

- **Item 86** infections broncho-pulmonaires du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte

Rédactrice/Relectrice Sabine Pereyre/Cecile Bebear

1. Classification

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* (de *mollis cutis* : peau molle). Ils sont dépourvus de paroi, d'où un aspect polymorphe et une insensibilité totale aux bêta-lactamines. Ce sont les plus petits procaryotes capables de répllication autonome.

La classe des *Mollicutes*, comprend quatre ordres, les *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* et *Anaeroplasmatales*, séparés d'après leur habitat naturel, leur exigence en stérols et un certain nombre d'autres propriétés. Le terme mycoplasmes continue à être utilisé pour désigner l'ensemble des *Mollicutes*. Les mycoplasmes seraient sur le plan phylogénétique des formes très évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible teneur en guanine + cytosine, ayant des ancêtres communs avec certains *Clostridia* (*Clostridium innocuum* et *C. ramosum*) et ayant perdu la capacité de synthétiser une paroi.

Dix-huit espèces ont été décrites chez l'homme, 14 appartenant au genre *Mycoplasma*, deux au genre *Ureaplasma* et deux au genre *Acholeplasma*. Certaines espèces sont toujours commensales et colonisent muqueuses respiratoires et génitales, d'autres sont responsables de différents types d'infections. Parmi les espèces respiratoires, seul *M. pneumoniae* a un pouvoir pathogène certain chez l'homme.

Compte tenu de sa très petite taille, *M. pneumoniae* a d'abord été pris pour un virus lors de sa découverte en 1944. Ce n'est qu'en 1962 qu'il a été cultivé en milieu acellulaire et identifié comme un mycoplasme. Présentant une forte affinité pour les cellules, c'est un intracellulaire facultatif.

2. Modes de transmission et épidémiologie

M. pneumoniae est transmis par voie respiratoire via de fines gouttelettes lors de contacts interhumains rapprochés. La période d'incubation est d'une à trois semaines. *M. pneumoniae* affecte essentiellement les enfants et les adultes jeunes mais peut toucher toutes les tranches d'âge. Les infections chez les sujets âgés sont volontiers plus sévères.

M. pneumoniae provoque des infections respiratoires se manifestant à l'état endémique, avec de petites poussées épidémiques tous les quatre à sept ans. Ainsi, une poussée épidémique s'est produite en 2010-2012 en Europe, en Israël et en Asie. Elle a touché la France entre 2010 et 2011. Ces infections sont relativement peu contagieuses, et atteignent souvent des communautés fermées, familles, écoles, navires, armées. Le caractère cyclique des épidémies est favorisé par la perte de l'immunité au cours du temps après une infection et l'existence de génotypes différents de *M. pneumoniae* circulant dans la population. La persistance du mycoplasme dans les voies respiratoires pendant quelques semaines après une infection contribue à la nature endémique de la maladie. Malgré cette persistance, *M. pneumoniae* n'appartient pas à la flore commensale des voies respiratoires. Cependant, un portage asymptomatique a récemment été rapporté dans les voies respiratoires hautes des enfants.

M. pneumoniae est responsable d'environ 30% des pneumonies communautaires chez l'enfant, taux atteignant plus de 50% chez l'enfant de 5 à 15 ans. C'est le deuxième agent bactérien, après le pneumocoque, responsable de pneumonies communautaires. Il arrive même en première position dans les pneumonies communautaires de l'enfant nécessitant une hospitalisation. Les coinfections avec d'autres agents bactérien ou viral sont fréquentes, notamment chez l'enfant où elles peuvent atteindre 65% des cas.

3. Physiopathologie

La pathogénie des infections à *M. pneumoniae* a été étudiée sur différents modèles, cultures d'organes et modèles expérimentaux animaux. Chez ces modèles animaux, *M. pneumoniae* colonise de manière diffuse l'épithélium respiratoire et provoque l'apparition de lésions histopathologiques comparables à celles observées chez l'homme. Plusieurs mécanismes contribuent à la pathogénie des infections à *M. pneumoniae*, des mécanismes directs tels que l'adhésion de *M. pneumoniae* à l'épithélium respiratoire suivie de lésions cellulaires localisées, la production d'une toxine et des mécanismes indirects immunopathologiques susceptibles d'entraîner des lésions d'origine auto-immune.

M. pneumoniae possède la propriété d'adhérer à de nombreux supports, verre, plastique, globules rouges et cellules de l'épithélium respiratoire. *In vivo*, cette adhésion permet au mycoplasme d'échapper au mouvement ciliaire et d'entrer en contact très étroit avec la membrane cellulaire. L'adhésion se fait au niveau d'une extrémité effilée, le "tip" (Figures 1 et 2), par l'intermédiaire de plusieurs protéines. L'adhésine majeure P1 est une protéine de 170 kDa, distribuée sur toute la surface du mycoplasme, mais plus concentrée au niveau de l'extrémité effilée. Des variations dans cette adhésine ont permis de séparer deux types principaux dans l'espèce *M. pneumoniae*, le type 1 et le type 2. L'adhésion se fait au niveau de récepteurs cellulaires renfermant de l'acide sialique. Elle entraîne un arrêt de l'activité ciliaire et des altérations cellulaires dues à la production de peroxydes et superoxydes par *M. pneumoniae*. La pénétration de *M. pneumoniae* à l'intérieur des cellules a été démontrée avec multiplication intracellulaire lente et durable du mycoplasme. Cette multiplication intracellulaire pourrait expliquer la persistance possible à l'état latent ou chronique.

La production d'une toxine, la CARD TX (Community-acquired respiratory distress syndrome toxin) a été démontrée en 2005. Elle présente une similarité de séquence significative avec une sous-unité de la toxine de *Bordetella pertussis* avec une activité d'ADP-ribosylation et se fixe au niveau du surfactant. Elle entraîne des lésions de l'épithélium respiratoire dans des modèles animaux. Elle est très conservée, très immunogène et peut être utilisée comme gène cible de détection pour la PCR.

A côté des lésions directes résultant de l'infection par *M. pneumoniae*, des mécanismes immunopathologiques interviennent, notamment dans les manifestations extra-respiratoires. L'aspect des lésions histologiques, la présence de lésions à distance à partir desquelles le mycoplasme est rarement isolé et la présence de divers auto-anticorps confortent cette hypothèse. Ces auto-anticorps seraient dus à des parentés antigéniques existant entre protéines d'adhésion et glycolipides membranaires de *M. pneumoniae* et certains tissus humains. Des variations antigéniques de protéines de surface ont aussi été décrites chez *M. pneumoniae*, pouvant être responsables de phénomènes d'échappement de la réponse immunitaire de l'homme.

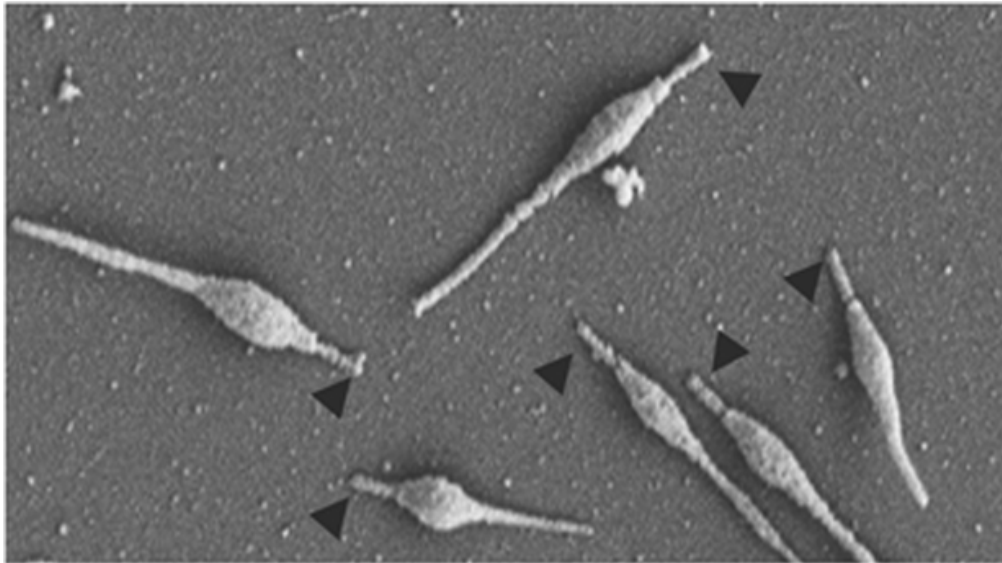


Figure 1. *M. pneumoniae* observé en microscopie électronique.
Les flèches noires montrent le « tip », extrémité effilée responsable de l'attachement.
D'après Atkinson *et al.* FEMS Microbiology reviews, 2008, 32, 956-73.

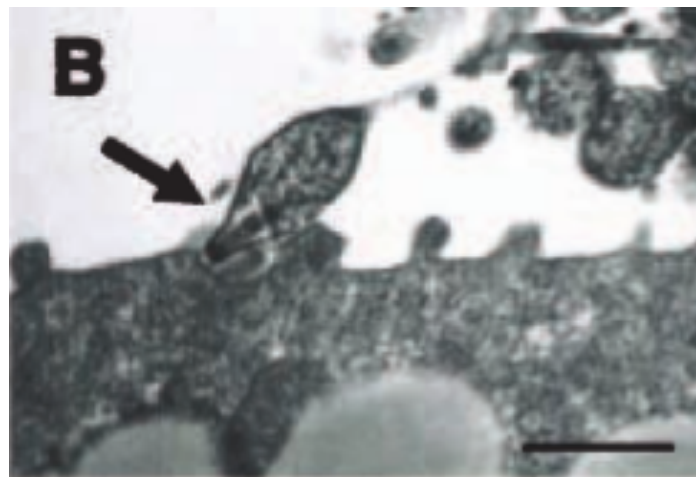


Figure 2. *M. pneumoniae* colonisant la trachée d'un hamster observée en microscopie électronique à transmission. La flèche indique le « tip » responsable de l'attachement.
Barre noire : 0,5 μm . D'après Krause *et al.* Molecular Microbiol. 2004, 51, 917-24.

4. Clinique

Manifestation respiratoires

M. pneumoniae provoque des infections respiratoires aiguës. Dans la majorité des cas, ces infections se traduisent par de simples trachéobronchites avec toux trainante pour lesquelles le diagnostic étiologique n'est pas porté. Dans sa forme la plus caractéristique, l'infection réalise un tableau de pneumonie atypique primitive, d'installation souvent progressive, avec un syndrome fébrile, des signes de la sphère ORL et une toux sèche. L'état général est bien conservé, les signes pulmonaires discrets à l'examen. L'aspect radiologique le plus fréquent consiste en des infiltrats interstitiels diffus. L'évolution est lente et favorable. La symptomatologie respiratoire ne permet pas de différencier les infections à *M. pneumoniae* de celles provoquées par d'autres agents de pneumonie.

Le rôle possible de *M. pneumoniae* dans l'asthme a été envisagé depuis longtemps. Des travaux expérimentaux réalisés chez la souris, montrent que *M. pneumoniae* provoque une inflammation des voies respiratoires avec une hyperréactivité bronchique. L'association de *M. pneumoniae* aux exacerbations aiguës de l'asthme a été rapportée essentiellement chez l'enfant. Un traitement par les macrolides a montré une amélioration et une résolution plus rapide des symptômes chez les sujets infectés par *M. pneumoniae*. Cependant l'effet des macrolides pourrait être relié aussi bien à leur activité antibactérienne qu'à leur activité anti-inflammatoire. L'implication de *M. pneumoniae* dans l'asthme reste finalement controversée. En effet, d'autres études menées chez l'enfant et l'adulte ont conclu qu'il n'y avait pas d'association entre les exacerbations aiguës de l'asthme ou l'asthme chronique et l'infection à *M. pneumoniae*.

Manifestations extra-respiratoires

Les manifestations extra-pulmonaires sont fréquentes, présentes dans près d'un quart des cas des infections à *M. pneumoniae*. Elles sont la conséquence de lésions infectieuses directes et/ou de manifestations auto-immunes. Les plus fréquentes sont dermatologiques et neurologiques. Les lésions cutanées incluent érythème polymorphe et syndrome de Stevens Johnson avec atteinte fréquente des muqueuses. Les encéphalites et le syndrome de Guillain-Barré constituent les manifestations neurologiques les plus fréquentes et sévères, où *M. pneumoniae* est impliqué dans respectivement 10 et 15% des cas. Des méningo-encéphalites sont aussi rapportées. Néanmoins, la responsabilité de *M. pneumoniae* est souvent difficile à démontrer en raison du caractère fortement immunopathologique de ces manifestations.

Les autres manifestations extra-respiratoires sont des atteintes ORL telles que des pharyngites, des anémies hémolytiques dues à la présence d'agglutinines froides, des thrombopénies, des arthrites notamment chez les sujets immunodéprimés, des myocardites, péricardites, endocardites, atteintes pancréatiques, digestives et rénales. Ces atteintes sont difficiles à rattacher à leur cause si elles surviennent isolément.

5. Diagnostic bactériologique

Prélèvement

Les prélèvements doivent ramener des cellules auxquelles le mycoplasme adhère. Les expectorations et sécrétions trachéales sont peu adaptées car contaminées par de

nombreuses bactéries. En raison du caractère diffus de l'infection, les prélèvements de gorge et, chez le jeune enfant, les aspirations nasopharyngées peuvent être utilisés. Les lavages bronchoalvéolaires sont également adaptés.

Les prélèvements utilisant des écouvillons doivent être mis dans des milieux de transport pour la culture : milieu 2SP (saccharose phosphate) sans antibiotique enrichi par 5 % de sérum de veau foetal, milieu UTM (Universal Transport Medium), milieu de culture pour mycoplasmes, car les mycoplasmes sont très sensibles à la dessiccation. Ils peuvent être conservés à + 4°C pendant 48 h, et au delà à -80°C.

Examen direct

L'examen direct n'est pas réalisé car *M. pneumoniae* n'est pas visible après coloration de Gram en raison de l'absence de paroi.

Culture

La culture de *M. pneumoniae* est fastidieuse et n'est pratiquée que dans des laboratoires spécialisés. Les milieux de culture utilisés sont complexes, renfermant du sérum (20 %) et de l'extrait de levure. Ils sont rendus sélectifs par addition d'une bêta-lactamine et / ou de polymyxine B et d'amphotéricine B. Le milieu de Hayflick modifié et le milieu SP-4 peuvent être utilisés. Il convient d'utiliser des milieux liquides et des milieux gélosés ou des milieux diphasiques. Les milieux liquides renferment du glucose et du rouge de phénol. Ils sont ensemencés en faisant des dilutions pour éliminer la présence possible d'inhibiteurs tissulaires. Les milieux gélosés sont ensemencés en touche.

Détection de la croissance

Pour les milieux liquides, elle se fait par le virage de l'indicateur coloré, traduisant une acidification du milieu glucosé par *M. pneumoniae*. Ce virage se fait après des délais variables de 6 à 20 j. Les résultats sont exprimés en unités de changement de couleur (UCC)/ml.

Sur milieux gélosés, les colonies petites (50 à 300 µm) doivent être recherchées à la loupe binoculaire (Figure 3). L'aspect des colonies est habituellement granulaire.

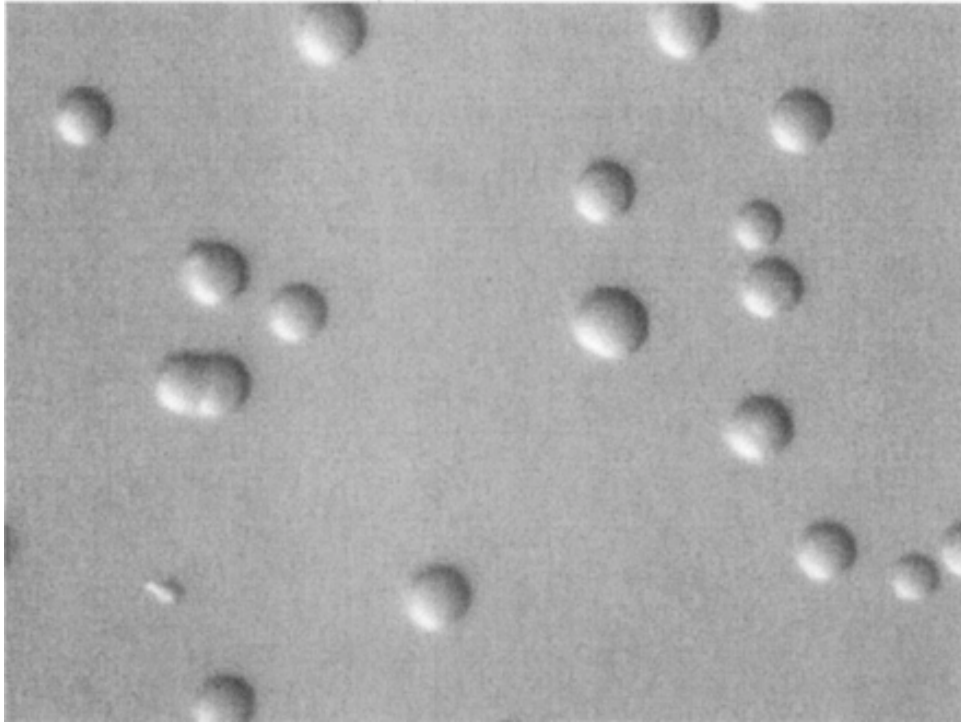


Figure 3. Colonies de *M. pneumoniae* poussant sur un milieu SP4, observées à la loupe binoculaire (grossissement X95).

D'après Waites *et al.* Clin. Microbiol. Rev. 2004, 17, 697-728.

Identification

L'identification peut être faite sur l'étude des propriétés biochimiques (fermentation du glucose). La méthode d'amplification par PCR est la méthode de choix pour l'identification à partir d'une culture. La technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été récemment adaptée à l'identification d'espèce des mycoplasmes humains à partir de cultures. Elle n'est pas utilisée en routine car elle nécessite de grands volumes de culture.

Diagnostic moléculaire

Les techniques de PCR donnent d'excellents résultats pour *M. pneumoniae* tant sur le plan de la sensibilité que de la spécificité et ont fait passer au second plan la culture. Différents systèmes ont été mis au point depuis la 1^{ère} publication en 1989, utilisant comme cible un fragment du gène de l'ATPase. Les techniques les plus fréquemment utilisées sont aujourd'hui des PCR en temps réel ayant pour cible le gène de l'adhésine P1, le gène de l'ARNr 16S ou le gène de la toxine CARDS. Seule la PCR permet de séparer *M. pneumoniae* et *M. amphoriforme*, espèce humaine qui croit dans les mêmes milieux de culture que *M. pneumoniae*. Il existe plusieurs trousse commercialisées de PCR monoplex ou multiplex détectant, par exemple, *M. pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et des virus respiratoires.

Le génotypage de *M. pneumoniae*, essentiel pour les études épidémiologiques, peut se faire par différentes méthodes. *M. pneumoniae* est une espèce homogène pour laquelle deux types avaient initialement été séparés par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). D'autres méthodes moléculaires ont été décrites, parmi lesquelles la MLVA

(Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis). Celle-ci permet de distinguer plus de 50 génotypes différents, est automatisable, et peut être utilisée directement sur les échantillons cliniques respiratoires.

Diagnostic indirect

Les sérologies sont les méthodes les plus utilisées en pratique en France mais ne permettent qu'un diagnostic a posteriori. La présence d'agglutinines froides n'est ni constante, ni spécifique. Deux techniques sont habituellement utilisées, la réaction de fixation du complément et les techniques immuno-enzymatiques.

La réaction de fixation du complément utilise un extrait glycolipidique de *M. pneumoniae* ou l'organisme entier. Elle détecte sans distinction IgG et IgM. Elle est valable à condition d'observer des critères d'interprétation stricts (séroconversion ou taux minimal présomptif d'au moins 1/64). Néanmoins, elle n'est pas très sensible et des réactions croisées ont été décrites avec d'autres micro-organismes tels que *M. genitalium* ou au cours d'affections neurologiques ou pancréatiques.

Les techniques ELISA permettent une détection séparée des IgG et des IgM. Ces tests sont plus sensibles et plus spécifiques que les autres. Cependant, le titre-seuil est variable selon les trousse et difficile à déterminer. Elles donnent de bons résultats pour les IgM, très utiles à rechercher chez l'enfant et l'adolescent où la présence d'IgM est précoce, une semaine après le début de l'infection.

Il existe des tests ELISA rapides détectant sur membrane les IgM seules, d'autres détectant simultanément les IgM et IgG. Ces trousse ont une sensibilité et une spécificité similaires aux autres trousse ELISA et offrent une grande rapidité d'exécution. Ils peuvent présenter un intérêt pour la détection des IgM chez l'enfant lorsque seul un sérum précoce est disponible.

Interprétation

Le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae* peut être affirmé :

- soit par la mise en évidence de *M. pneumoniae* par PCR chez un patient car *M. pneumoniae* n'appartient pas à la flore commensale. Sa présence est habituellement pathologique, à l'exception des périodes épidémiques où une colonisation asymptomatique par *M. pneumoniae* a été décrite. La PCR présente l'avantage de se positiver dès la première semaine de l'infection. Elle peut ensuite rester positive quelques semaines malgré un traitement antibiotique efficace.

- Soit par sérodiagnostic :

Après la primo-infection, les anticorps apparaissent après 7 à 10 jours, atteignent un pic à 3 à 6 semaines, puis leurs taux diminuent en quelques mois, voire un an. L'infection aiguë est confirmée par la présence d'IgM ou en leur absence par une augmentation significative du titre des IgG entre les deux prélèvements. Les IgM ne sont habituellement pas présentes lors des réinfections. Elles peuvent persister pendant plusieurs mois après l'infection aiguë, en particulier chez l'enfant. L'analyse de deux sérums consécutifs a démontré une bien meilleure sensibilité que celle d'un seul sérum.

Au final, l'association de la PCR et de la sérologie est actuellement le meilleur moyen de porter un diagnostic d'infection à *M. pneumoniae*, la PCR étant plus sensible que la sérologie pour le diagnostic précoce d'une infection aiguë.

6. Sensibilité aux antibiotiques et traitement

Méthodes d'étude

La méthode classique d'antibiogramme par diffusion à l'aide de disques n'est pas utilisable. Les milieux complexes nécessaires pour les mycoplasmes sont éloignés des conditions standard recommandées pour les bactéries classiques. Cependant des recommandations ont été faites aux USA par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), qui a proposé des protocoles standardisés pour l'étude de l'activité *in vitro* des antibiotiques sur *M. pneumoniae*. Ainsi, les CMI peuvent être déterminées par dilution en milieu liquide ou gélosé en utilisant un milieu adapté à *M. pneumoniae*. Ces déterminations étant réservées à des laboratoires spécialisés, la sensibilité de *M. pneumoniae* aux antibiotiques n'est pas étudiée en routine. La résistance aux macrolides peut aussi être recherchée par des méthodes de biologie moléculaire comme la PCR en temps réel.

Résistance naturelle et antibiotiques actifs

Du fait de leur absence de paroi, tous les mycoplasmes résistent aux antibiotiques agissant sur la biosynthèse du peptidoglycane, bêta-lactamines, glycopeptides, fosfomycine. Ils résistent également aux polymyxines, sulfamides, triméthoprime, acide nalidixique et à la rifampicine, du fait d'une mutation naturelle du gène *rpoB* de la sous-unité β de l'ARN polymérase.

Les antibiotiques actifs utilisables en thérapeutique sont les tétracyclines, les macrolides et apparentés et les fluoroquinolones. L'effet *in vitro* des antibiotiques sur *M. pneumoniae* est seulement bactériostatique, mis à part le cas des fluoroquinolones et des kétolides.

Résistance acquise

Le seul mécanisme de résistance observé chez *M. pneumoniae* consiste en des altérations de la cible des antibiotiques par mutation. L'existence de plasmides de résistance n'a jamais été démontrée chez les mycoplasmes.

Seule la résistance aux macrolides et apparentés est décrites chez des isolats cliniques de *M. pneumoniae*. Aucune souche clinique de *M. pneumoniae* résistante aux tétracyclines ou aux fluoroquinolones n'a été décrite. Cependant, des mutants résistants ont pu être sélectionnés *in vitro*.

La résistance acquise aux macrolides est due à des mutations dans le gène cible des macrolides qui code pour l'ARNr 23S, plus précisément au niveau de la boucle peptidyl-transférase conservée du domaine V. Les nucléotides A2058 et A2059 (numérotation *Escherichia coli*) sont les plus fréquemment affectés, mais d'autres nucléotides de cette boucle peuvent être touchés. Les substitutions de type A2058G et A2059G conduisent à des hauts niveaux de résistance aux macrolides. Ces mutations associées à la résistance aux macrolides peuvent être décelées par PCR en temps réel directement à partir des échantillons cliniques.

La résistance acquise aux macrolides est en augmentation sensible chez *M. pneumoniae*. Exceptionnelles avant les années 2000, des souches de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides ont récemment émergé dans le monde, d'abord en Asie où cette résistance avoisine actuellement 80% des souches au Japon et concerne pratiquement toutes les souches en Chine, à la fois chez l'enfant et chez l'adulte. Cette résistance est la

source d'échecs thérapeutiques. Elle est aussi apparue en Europe, avec un taux de 8-10% actuellement en France et un taux similaire aux USA.

Traitement

Le traitement des infections à *M. pneumoniae* repose en premier lieu sur l'administration de macrolides, utilisables quel que soit l'âge du patient, tels que la roxithromycine, l'azithromycine ou la clarithromycine. La durée du traitement varie entre 5 et 15 jours selon la molécule utilisée, les durées les plus courtes concernant les traitements à base d'azithromycine. En cas de résistance aux macrolides, les tétracyclines peuvent être utilisées dès 8 ans et les fluoroquinolones chez l'adulte à partir de 15 ans. En cas d'infection à *M. pneumoniae* résistant aux macrolides chez un enfant de moins de 8 ans, les fluoroquinolones sont habituellement utilisées malgré les contre-indications.

Le traitement antibiotique permet de raccourcir la durée d'évolution de la maladie. Il n'est pas nécessaire de contrôler la disparition du mycoplasme après le traitement. Celui-ci peut en effet rester détectable plusieurs semaines par PCR malgré la guérison et un traitement antibiotique adapté.

7. Prophylaxie-vaccinations

Différents types de vaccins ont été testés vis-à-vis de *M. pneumoniae*. Aucun n'est à ce jour disponible. Les plus prometteurs seraient probablement constitués de fractions antigéniques purifiées contenant la protéine P1.

8. Points clefs à retenir

- Comme tous les mycoplasmes, *M. pneumoniae* est caractérisé par une absence de paroi. Il est donc invisible à la coloration de Gram et résiste à tous les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne.
- Il est transmis de façon inter-humaine par voie aérienne. Les infections évoluent de façon endémique avec des poussées épidémiques tous les 4 à 7 ans.
- *M. pneumoniae* est responsable de trachéo-bronchites et de pneumonies atypiques plus fréquentes chez l'enfant et l'adulte jeune. Des manifestations extra-respiratoires dermatologiques et neurologiques ne sont pas rares.
- *M. pneumoniae* est peu cultivé en routine car la culture est fastidieuse. La PCR permet un diagnostic précoce à partir d'échantillons respiratoires (prélèvements de gorge et aspirations nasopharyngées). La sérologie permet un diagnostic souvent rétrospectif.
- *M. pneumoniae* est sensible à trois familles d'antibiotiques, macrolides et apparentés, tétracyclines et fluoroquinolones. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques n'est pas réalisée en routine.
- Les macrolides sont le traitement de première intention. La résistance acquise aux macrolides est en augmentation dans le monde et affecte actuellement 8 à 10% des souches en France. Cette résistance peut être détectée par PCR en temps réel directement à partir de l'échantillon clinique.