

---

# COMPARAISON DE LA SOUCHE 7784 HYPOVIRULENTE DE *MYCOPLASMA* *AGALACTIAE* A LA SOUCHE TYPE VIRULENTE PG2 PAR LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION SOUSTRACTIVE SUPPRESSIVE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Nathalie BONNEFIN**  
Née, le 22 juin 1978 à BERGERAC (Dordogne)

---

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Marc MARENDA

---

## JURY

PRESIDENT :  
M. Gérard CHABANON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
M. Marc MARENDA  
M. Jean EUZEBY

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE





MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. CABANIE Paul, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. CHANTAL Jean, *Pathologie infectieuse*
- M. DARRE Roland, *Productions animales*
- M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. GUELFY Jean-François, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
- M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1<sup>re</sup> CLASSE**

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- M. BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. DELVERDIER Maxence, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. EECKHOUTTE Michel, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. MILON Alain, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
- M. SAUTET Jean, *Anatomie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

- Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme KOLF-CLAUW Martine, *Pharmacie - Toxicologie*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*

**PROFESSEUR ASSOCIE**

- M. HENROTEAUX Marc, *Médecine des carnivores*

**INGENIEUR DE RECHERCHES**

- M. TAMZALI Youssef, *Clinique équine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*  
M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

**MAITRE DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**MAITRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE**

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*  
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*  
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*  
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*  
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*  
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle CADIERGUES Christelle, *Dermatologie*  
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*  
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. DUCOS Alain, *Zootechne*  
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*  
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*  
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*  
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. MAREDA Marc, *Pathologie de la reproduction*  
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*  
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*  
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*  
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*  
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*  
M. SANS Pierre, *Productions animales*  
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. VALARCHER Jean-François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS**

- M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*  
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

- M. REYNOLDS Brice, *Pathologie chirurgicale*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*  
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*  
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*  
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

**A Monsieur le Professeur Gérard CHABANON**

*Professeur des Universités*

*Praticien hospitalier*

*Bactériologie - Virologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommage respectueux

**A Monsieur le Docteur Marc MARENDA**

*Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

*Pathologie de la reproduction*

Qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance

**A Monsieur le Professeur Jean EUZEBY**

*Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

*Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie*

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Qu'il trouve ici la marque de toute notre considération



**A Karine, Nelly, Jonathan, Emeline et Marion,**

**A Caroline, Marina, Plouf, Julien, Céline, Hélène et Didier, Fred, Charles,  
Milouze, Stéphane...**

Pour tous les très bons moments passés ensembles

**A Jan, Erik, Alexandre, Richard et tous les autres,  
Merci pour tous ces grands moments d'émotion**

**A mes parents.**





# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>14</b>
<b>1ÈRE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>16</b>
<b>I/ PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES MYCOPLASMES.....</b>	<b>18</b>
I.1/ TAXONOMIE, PHYLOGÉNIE, ET HABITAT.....	18
I.2/ LA MEMBRANE PLASMIQUE .....	19
I.3/ TAILLE DU GÉNOME ET COMPOSITION EN BASES .....	19
I.4/ INFORMATION GÉNÉTIQUE .....	21
I.5/ RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES.....	21
I.6/ MÉCANISMES DE PATHOGÉNICITÉ.....	23
I.6.1/ <i>Connaissances actuelles sur les mécanismes de pathogénicité des mycoplasmes.....</i>	<i>23</i>
I.6.2/ <i>Bases pour la découverte de nouveaux facteurs de virulence chez M. agalactiae.....</i>	<i>24</i>
I.7/ HYPERVARIABILITÉ ANTIGÉNIQUE.....	25
I.8/ HÉTÉROGÉNÉITÉ INTRASPÉCIFIQUE.....	27
I.8.1/ <i>Hétérogénéité antigénique .....</i>	<i>28</i>
I.8.2/ <i>Hétérogénéité génomique .....</i>	<i>28</i>
I.8.3/ <i>Hétérogénéité protéique.....</i>	<i>28</i>
<b>II/ L'AGALACTIE CONTAGIEUSE A MYCOPLASMA AGALACTIAE.....</b>	<b>30</b>
II.1/ ETIOLOGIE.....	30
II.2/ CLINIQUE.....	30
II.3/ RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE ET ÉVOLUTION DANS UN TROUPEAU ATTEINT [6, 8].....	31
II.4/ SOURCES DE CONTAMINATION ET MODES DE TRANSMISSION [6, 8].....	31
II.4.1/ <i>Les sources de contamination.....</i>	<i>31</i>
II.4.2/ <i>Les modes de transmission.....</i>	<i>32</i>
II.5/ DIAGNOSTIC [7, 8].....	32
II.5.1/ <i>Diagnostic étiologique .....</i>	<i>32</i>
II.5.2/ <i>Diagnostic sérologique.....</i>	<i>33</i>
II.6/ TRAITEMENT - PRÉVENTION.....	33
II.6.1/ <i>Traitement.....</i>	<i>33</i>
II.6.2/ <i>Prévention.....</i>	<i>34</i>
<b>2ÈME PARTIE : ETUDE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>36</b>
<b>I/ PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE .....</b>	<b>38</b>
I.1/ LA MÉTHODE UTILISÉE : L'HYBRIDATION SOUSTRACTIVE SUPPRESSIVE.....	38
I.2/ CHOIX DES SOUCHES COMPARÉES.....	39

<b>II/ PRINCIPE DE LA TECHNIQUE UTILISEE : L'HYBRIDATION SOUSTRACTIVE SUPPRESSIVE [11].....</b>	<b>40</b>
II.1/ DIGESTION ET LIGATION DE L'ADN.....	42
II.2/ DEUX HYBRIDATIONS SONT ENSUITE RÉALISÉES.....	42
II.3/ AMPLIFICATION PAR PCR.....	43
<b>III/ MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>44</b>
III.1/ LES SOUCHES.....	44
III.2/ LES OLIGONUCLÉOTIDES.....	44
III.3/ LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	47
III.4/ LES PRÉPARATIONS D'ADN.....	47
III.5/ L'HYBRIDATION SOUSTRACTIVE SUPPRESSIVE (HSS).....	48
<i>III.5.1/ Digestion.....</i>	<i>48</i>
<i>III.5.2/ Ligation.....</i>	<i>48</i>
<i>III.5.3/ Soustraction 1.....</i>	<i>48</i>
<i>III.5.4/ Soustraction 2.....</i>	<i>49</i>
<i>III.5.5/ PCR 1.....</i>	<i>49</i>
<i>III.5.6/ PCR 2.....</i>	<i>49</i>
III.6/ TRANSFORMATION.....	49
III.7/ SYNTHÈSE DES SONDAS.....	50
III.8/ LES SOUTHERN BLOT.....	50
III.9/ ANALYSE DES SÉQUENCES SUR ORDINATEUR.....	51
<b>IV/ RESULTATS - DISCUSSION.....</b>	<b>52</b>
IV.1/ PRÉSENTATION DES RÉSULTATS.....	52
IV.2/ MISE EN ÉVIDENCE D'UNE INSTABILITÉ GÉNÉTIQUE CHEZ <i>M. AGALACTIAE 7784</i> .....	56
IV.3/ ÉTUDE DES SONDAS SPÉCIFIQUES À LA SOUCHE <i>PG2</i> .....	66
IV.4/ PROBLÈMES LIÉS AU BRUIT DE FOND.....	77
IV.5/ FAIBLE PROPORTION DE FRAGMENTS TESTER-SPÉCIFIQUES DANS LA BANQUE.....	81
IV.6/ PRÉSENCE ÉVENTUELLE DE SÉQUENCES RÉPÉTÉES.....	84
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>86</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### **Tableaux :**

<u>Tableau 1</u> : Taxonomie et hôtes des Mollicutes.....	16
<u>Tableau 2</u> : Principales caractéristiques du génome des mycoplasmes, comparaison avec <i>H. influenzae</i> et <i>E. coli</i> .....	19
<u>Tableau 3</u> : Caractéristiques cliniques de l'agalactie contagieuse à <i>M. agalactiae</i> chez les ovins et les caprins.....	28
<u>Tableau 4</u> : Souches de mycoplasme utilisées, sous-collection A.....	44
<u>Tableau 5</u> : Souches de <i>M. agalactiae</i> des Pyrénées Atlantiques utilisées, sous-collection B.....	45
<u>Tableau 6</u> : Les oligonucléotides utilisés.....	45
<u>Tableau 7</u> : Présentation des différentes conditions testées.....	50
<u>Tableau 8</u> : Résultats des southern blot sur la sous-collection A de souches de <i>M. agalactiae</i> .....	52
<u>Tableau 9</u> : Résultats des southern blot avec des souches de <i>M. agalactiae</i> isolées dans les Pyrénées Atlantiques (sous-collection B).....	53
<u>Tableau 10</u> : Résultats de l'analyse de la séquence G7.....	62
<u>Tableau 11</u> : Résultats de l'analyse de la séquence P3.....	68
<u>Tableau 12</u> : Résultats de l'analyse de la séquence T2.....	69
<u>Tableau 13</u> : Les différentes conditions testées lors de la comparaison des souches PG2 et 7784 par la technique d'hybridation soustractive suppressive.....	77

### **Figures :**

<u>Figure 1</u> : Schéma de la technique d'hybridation soustractive suppressive.....	40
<u>Figure 2</u> : Adaptateurs schématisés.....	45
<u>Figure 3</u> : Evaluation de la spécificité des sondes à la souche Tester par southern blot sur bandelettes en Nylon.....	53
<u>Figure 4</u> : Analyse par southern blot des sondes G7, D5, P3 et T2 sur les souches de la sous-collection A.....	54

<u>Figure 5</u> : Préparations de l'ADN 7784.....	57
<u>Figure 6</u> : Comparaison des profils <i>vpma</i> de 7 préparations différentes d'ADN de la souche 7784 avec une préparation d'ADN de la souche PG2.....	58
<u>Figure 7</u> : Southern blot avec la sonde G7 sur 7 préparations d'ADN de la souche 7784 et sur une préparation d'ADN de la souche PG2.....	58
<u>Figure 8</u> : Schéma de repiquage des souches PG2 et 7784 en milieu SP-4 Pyruvate et en milieu Aluotto.....	60
<u>Figure 9</u> : Analyse de préparations d'ADN des souches PG2 et 7784 par southern blot pour rechercher une éventuelle perte du fragment G7.....	61
<u>Figure 10</u> : Représentation schématique de la protéine LppQ.....	63
<u>Figure 11</u> : Profils de la sonde globale, du polymorphisme de restriction, des fragments chimères et des fragments répétés.....	65
<u>Figure 12</u> : Comparaison des séquences nucléiques et protéiques des fragments P3 et T2 avec l'opéron de la souche Afadé de <i>Mycoplasma mycoides mycoides</i> SC.....	72
<u>Figure 13</u> : Illustration du bruit de fond (amplification des contrôles négatifs).....	76
<u>Figure 14</u> : Essai pour diminuer l'amplification des soustractions contrôles.....	78
<u>Figure 15</u> : Un exemple de fragment chimère schématisé.....	82

## INTRODUCTION GENERALE

L'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* des ovins et caprins est un syndrome principalement caractérisé par des atteintes mammaires, articulaires et oculaires (et parfois respiratoires). De part sa très large distribution mondiale et les pertes économiques qu'elle provoque, l'agalactie contagieuse constitue une entrave sanitaire majeure au développement des productions laitières ovines et caprines. L'importance de ce syndrome est soulignée par le fait qu'il est inscrit sur la liste B de l'OIE (Office International des Epizooties) [28] ; cette liste regroupe en effet les maladies transmissibles considérées comme importantes du point de vue socio-économique et / ou sanitaire au niveau national et dont les effets sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale ne sont pas négligeables.

Très répandue dans les pays circumméditerranéens, l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* persiste en France sous forme enzootique dans les Pyrénées Atlantiques (ovins), et en Savoie (caprins). En France, des programmes de lutte reposant sur la mise en place de réglementations régionales ont été mis en place essentiellement dans les Pyrénées Atlantiques ; l'objectif de ce type de prophylaxie sanitaire est d'abord de circonscrire progressivement l'infection à certaines zones, puis, à terme, de l'éradiquer [7].

Cependant, malgré ces efforts, l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* n'est toujours pas complètement éradiquée, ce qui montre les limites des programmes sanitaires mis en oeuvre. Cette situation pourrait être liée au manque de connaissances fondamentales sur cette pathologie et son agent, en particulier concernant les interactions fines entre l'hôte et son pathogène. Il est donc devenu nécessaire de découvrir les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *M. agalactiae*, ce qui pourrait nous permettre de proposer de nouvelles stratégies de lutte contre la maladie.

Pour cela, une piste intéressante consiste à étudier des souches hypo- ou avirulentes de *M. agalactiae*. Une étude récente [36] a ainsi montré que certaines souches de *M. agalactiae* induisent des symptômes atténués par rapport aux souches pathogènes. Cette observation, basée sur un modèle expérimental, est corroborée par des études cliniques de terrain, dans les Pyrénées Atlantiques et en Aveyron, où *M. agalactiae* a été isolé dans des élevages ne présentant pas de signes cliniques de l'agalactie contagieuse.

La comparaison de telles souches avec des souches pleinement virulentes pourrait contribuer à la compréhension des bases moléculaires du pouvoir pathogène de *M. agalactiae*.

Pour cela, une approche simple consiste à comparer le génome des souches concernées. L'Hybridation Soustractive Suppressive (HSS) est une méthode efficace qui permet trouver des séquences d'ADN présentes dans un génome (Tester) et pas dans l'autre (Driver). Cette technique a été choisie lors de ce travail de thèse pour comparer la souche hypovirulente 7784 à la souche type virulente PG2.

Avant d'aborder les données obtenues au cours de cette étude, nous présenterons quelques propriétés marquantes des mycoplasmes, et plus particulièrement de *M. agalactiae*, ainsi que l'agalactie contagieuse, ce qui rendra plus explicite le choix de notre stratégie expérimentale et la discussion de nos résultats.

## **1<sup>ère</sup> Partie : Etude bibliographique**



<p><b>Ordre I : <i>Mycoplasmatales</i></b>  <u>Famille I : <i>Mycoplasmataceae</i></u>  Genre I : <b><i>Mycoplasma</i></b> : 107 espèces (homme et animaux)  Genre II : <i>Ureaplasma</i> : 7 espèces (homme et animaux)</p>
<p><b>Ordre II : <i>Entomoplasmatales</i></b>  <u>Famille I : <i>Entomoplasmataceae</i></u>  Genre I : <i>Entomoplasma</i> : 6 espèces (insectes et plantes)  Genre II : <i>Mesoplasma</i> : 12 espèces (insectes et plantes)  <u>Famille II : <i>Spiroplasmataceae</i></u>  Genre I : <i>Spiroplasma</i> : 34 espèces (insectes et plantes)</p>
<p><b>Ordre III : <i>Acholeplasmatales</i></b>  <u>Famille I : <i>Acholeplasmataceae</i></u>  Genre I : <i>Acholeplasma</i> : 14 espèces (homme, animaux, insectes et plantes)</p>
<p><b>Ordre IV : <i>Anaeroplasmatales</i></b>  <u>Famille I : <i>Anaeroplasmataceae</i></u>  Genre I : <i>Anaeroplasma</i> : 4 espèces (rumen des ruminants)  Genre II : <i>Asteroleplasma</i> : 1 espèce (rumen des ruminants)</p>
<p>Statut taxonomique non défini : <i>Phytoplasma</i></p>

Tableau 1 : Taxonomie et hôtes des Mollicutes [21].

*Mycoplasma agalactiae* est une bactérie qui appartient à la classe des *Mollicutes* (du latin *mollis* = molle, *cutis* = peau), famille des *Mycoplasmataceae*, genre *Mycoplasma*. Le terme "mycoplasmes" a été retenu par l'usage courant pour désigner la classe bactérienne des mollicutes.

Dans cette première partie, les principales caractéristiques des mycoplasmes vont être présentées, en s'attachant plus particulièrement à *M. agalactiae*. Elles seront suivies par quelques données sur l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae*.

## I/ PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES MYCOPLASMES

Les membres de la classe des mollicutes sont des bactéries originales dont certaines caractéristiques, qui seront développées dans les paragraphes suivants, les distinguent au sein du monde bactérien : il s'agit par exemple de la très petite taille de leur génome, de la faible teneur en base G + C du génome et de l'absence de paroi. Une autre propriété remarquable des mycoplasmes est leur capacité à échapper au système immunitaire de l'hôte en modifiant la présentation des protéines à la surface de leur membrane. Cette dernière propriété peut rendre la lutte contre cet agent difficile et gêne la conception de nouveaux vaccins.

### I.1/ Taxonomie, phylogénie, et habitat

La comparaison des séquences de l'ARN ribosomique 16S des mycoplasmes avec celles des autres bactéries a montré que les mycoplasmes représentent un groupe phylogénétique homogène issu d'un ancêtre des bactéries Gram positif à faible teneur en bases G + C dans l'ADN génomique. Cette homogénéité phylogénétique n'est cependant pas synonyme de faible diversité d'hôte : comme le démontre le tableau 1, les mollicutes sont des micro-organismes très largement répandus dans la nature et présentent des hôtes très divers.

Concernant *M. agalactiae*, cette bactérie est phylogénétiquement très proche de *Mycoplasma bovis* : l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S de ces deux espèces a montré 99,47 % de similarité. Cependant le pourcentage estimé d'homologie au niveau génomique, entre *M. agalactiae* et *M. bovis*, n'est que de 40 % [41]. *M. agalactiae* et *M. bovis* sont tous deux pathogènes de ruminants, ils ont des organes cibles similaires et peuvent induire les mêmes symptômes, mais ces deux espèces ont un spectre d'hôte très spécifique : *M.*

*agalactiae* est isolé d'ovins ou de caprins alors que *M. bovis* est isolé de bovins (bien que de rares exceptions aient été rapportées).

La proximité entre ces deux espèces sera à nouveau abordée plus tard dans cette étude.

## I.2/ La membrane plasmique

L'absence de paroi rigide est la principale caractéristique qui différencie les mycoplasmes des autres procaryotes. Les mycoplasmes sont dotés d'un seul type de membrane, la membrane cytoplasmique (ils ne possèdent pas de membrane intracytoplasmique) : elle constitue donc leur seule interface avec le milieu environnant.

Certaines particularités de ces organismes découlent de l'absence de paroi rigide : leur plasticité de forme, la morphologie typique des colonies en culture (aspect caractéristique "d'œuf sur le plat"), leur sensibilité à la lyse (par choc osmotique, par l'alcool, par les solvants organiques, par les détergents et par les anticorps et le complément) [31]. L'absence de paroi rend aussi les mycoplasmes résistants aux antibiotiques qui dégradent ou inhibent la synthèse de la paroi (les  $\beta$ -lactamines : pénicillines et céphalosporines).

Les mycoplasmes sont incapables de réguler la fluidité de leur membrane par la biosynthèse d'acides gras. Ils surmontent cette difficulté en incorporant de grandes quantités de cholestérol exogène dans leur membrane [33].

Les lipoprotéines membranaires sont présentes en nombre beaucoup plus élevé dans la membrane des mollicutes que dans celle des autres bactéries et constituent la majeure partie des antigènes dominants. Par exemple, *Acholeplasma laidlawii* possède environ trois fois plus de lipoprotéines membranaires que *Lactobacillus lactis* ou *Bacillus subtilis* [32]. Certaines de ces lipoprotéines font l'objet de variations de taille et d'expression [33], dont les modalités et les conséquences seront développées au cours du paragraphe I.7.

## I.3/ Taille du génome et composition en bases

- La taille du génome des mycoplasmes est réduite : elle varie de 580 kb pour *M. genitalium* à 1380 kb pour *M. mycoides mycoides* Large Colony. *M. genitalium* possède le plus petit génome cellulaire connu. A titre de comparaison, la taille du génome d'*Haemophilus influenzae* est de 1830 kb et celle du génome d'*Escherichia coli* est de 4640 kb (tableau 2).

Les mycoplasmes et les uréaplasmes, considérés phylogénétiquement comme étant les mollicutes les plus récents, possèdent un génome plus petit que les acholéplasmes et les spiroplasmes (la taille maximum étant de 2200 kb pour *Spiroplasma ixodetis*). L'évolution s'est donc faite par réduction de la taille du génome et perte de gènes, les premiers gènes perdus comprenant ceux nécessaires à la synthèse de la paroi bactérienne [33].

- Le génome des mycoplasmes contient, sauf exceptions, de 24 à 33 % de bases G + C (Guanine + Cytosine) (32 % pour *M. genitalium*), ce qui est faible par rapport aux autres bactéries pour lesquelles cette valeur peut atteindre 75 %. Toujours à titre de comparaison le génome d'*H. influenzae* contient 38 % de bases G + C et celui d'*E. coli* en contient 50 % (tableau 2).

Par rapport aux régions codantes, les régions intergéniques possèdent une plus grande proportion de bases A + T (Adénine + Thymine), pouvant atteindre 80 à 90 % [33].

- La taille du génome de *Mycoplasma agalactiae* est d'environ 945 kb et ce génome contient de 30,5 à 34,2 % de G + C [22, 41].

La petite taille de *M. agalactiae* se prête bien à la technique d'hybridation soustractive suppressive. La proportion de bases G + C est importante à prendre en compte pour déterminer la température d'hybridation lors des soustractions (une plus faible proportion de bases G + C implique une baisse de la température d'hybridation).

	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Taille du génome	580 kb	945 kb	1830 kb	4640 kb
Composition en bases (G+C%)	32 %	30,5 à 34,2 %	38 %	50 %
Nombre de régions codantes	479	ND	1703	4288

Tableau 2 : Principales caractéristiques des mycoplasmes, comparaison avec *H. influenzae* et *E. coli* [33].

ND = Non Déterminé

#### I.4/ Information génétique

Les mycoplasmes sont caractérisés par l'usage d'un code non universel. Le codon UGG est le seul codon tryptophane dans le code universel. Or il est trop riche en guanine pour l'environnement génomique pauvre en G + C des mycoplasmes. Le codon UGA, codon Stop dans le code universel, est devenu chez les mollicutes phylogénétiquement récents tels que *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Mesoplasma* et *Spiroplasma* un codon tryptophane grâce à l'apparition d'un nouvel ARN de transfert [33].

L'information génétique des mycoplasmes est réduite et sélective : les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivants capables de s'auto-reproduire sans avoir recours aux cellules de l'hôte.

*M. genitalium* (580 kb) et *M. pneumoniae* (816 kb) sont considérés comme des "cellules minimales", et ont donc été utilisés comme organismes modèles lors des premiers programmes de séquençage complet du génome des mollicutes. Après séquençage complet et comparaison des génomes, il apparaît que le nombre de régions codantes dans le génome de *M. genitalium* est de seulement 479, contre 677 chez *M. pneumoniae*, 1703 chez *H. influenzae* et 4288 chez *E. coli* (tableau 2).

La comparaison des séquences de *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *H. influenzae* et *E. coli* indique que les mycoplasmes ont perdu au cours de leur évolution la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés. Ils ont donc besoin de se trouver en présence de la totalité des acides aminés, que ce soit dans l'hôte ou dans le milieu de culture artificiel. Les mycoplasmes ont aussi perdu beaucoup de gènes impliqués dans la synthèse des cofacteurs enzymatiques. Les mycoplasmes ont donc un comportement de parasite vis à vis de leur hôte ; leur culture, fastidieuse, requiert des milieux complexes et coûteux (extraits de levures, sérums d'animaux) [20, 33].

#### I.5/ Réarrangements chromosomiques

Outre sa faible taille, le génome des mycoplasmes est variable au sein des souches d'une même espèce. Par exemple la taille du génome de différentes souches d'*Ureaplasma urealyticum* varie de 760 à 1140 kb [10]. Une des raisons de la variabilité de la taille du génome est la présence fréquente, en nombre variable, d'éléments répétés, qui consistent souvent en des fragments de gènes codant pour des protéines différant en taille et en nombre, ou en des séquences d'insertion [32]. Cette variabilité de la taille du génome à l'intérieur

d'une espèce peut aussi être la conséquence de l'intégration de séquences virales dans le chromosome, comme cela a été démontré chez *Spiroplasma citri* où ces séquences peuvent représenter jusqu'à 1/12<sup>ème</sup> du génome entier [32, 33].

Ces variations de taille du génome montrent la grande plasticité du génome des mycoplasmes, qui subit de fréquents réarrangements : insertions, délétions (dont un exemple sera présenté dans la partie expérimentale de cette thèse) et inversions de gènes ou de segments du génome. Les importants réarrangements d'ADN observés chez certaines espèces situent le chromosome mycoplasmaïque parmi les génomes les plus dynamiques et les plus variables connus [31, 34, 38].

Les recombinaisons génétiques peuvent être réparties en trois catégories selon le mécanisme impliqué : les recombinaisons homologues, site-spécifiques, et illégitimes.

Les recombinaisons homologues ont lieu entre deux séquences présentant une homologie sur une longueur importante et sont possibles grâce à la protéine RecA qui joue un rôle prépondérant. Les recombinaisons homologues peuvent avoir lieu entre des éléments répétés dans le génome des mycoplasmes.

Les recombinaisons site-spécifiques concernent des séquences d'ADN spécifiques, reconnues et liées par une recombinase qui effectue des échanges de brins, des clivages et des ligations. Les séquences d'insertion, les transposons et les génomes des phages lysogéniques utilisent ce mécanisme pour s'insérer dans des sites du génome des mycoplasmes. Toutes les séquences d'insertion découvertes chez les mycoplasmes présentent un pourcentage élevé de bases A + T et utilisent le codon UGA comme codon tryptophane, ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'acquisitions récentes chez les mycoplasmes par transfert horizontal avec d'autres genres bactériens.

Enfin, les recombinaisons illégitimes ont lieu entre des séquences présentant peu ou pas d'homologie. Cela peut avoir lieu à la suite d'erreurs d'enzymes capables de cliver et de relier l'ADN comme les nucléases et les topoisomérases, ou à la suite d'erreurs lors de la réplication. Les séquences répétées en tandem sont susceptibles de s'étendre ou de se contracter à la suite de mésappariements de type "strand slippage" (glissement de brin) [38].

## I.6/ Mécanismes de pathogénicité

### **I.6.1/ Connaissances actuelles sur les mécanismes de pathogénicité des mycoplasmes**

La synthèse de toxine n'a jamais été mise en évidence chez les mycoplasmes. Les lipoprotéines membranaires de plusieurs mycoplasmes pathogènes sont supposées être des facteurs de virulence étant donné leur capacité à induire la production de cytokines pro inflammatoires *in vitro*. De plus certains intermédiaires du métabolisme, comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou les radicaux superoxydes, sont des facteurs de virulence potentiels. Bien que le rôle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la virulence n'ait pas été établi *in vivo*, une hypothèse attribuant une implication de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le pouvoir pathogène suggère qu'il pourrait provoquer des dommages au niveau de la membrane plasmique des cellules de l'hôte [33, 46].

La plupart des mycoplasmes adhère fortement aux épithéliums respiratoire, urogénital, digestif ou de la mamelle. L'adhésion des mycoplasmes aux cellules hôtes est un prérequis pour permettre la colonisation et l'infection. Les adhésines (composants membranaires responsables de l'adhésion) les mieux connues sont celles de *M. pneumoniae* et de *M. genitalium*. Bien que les adhésines soient les principales molécules impliquées, l'adhésion est un processus multifactoriel impliquant un certain nombre de protéines membranaires accessoires. Ces protéines accessoires agissent de concert avec les éléments du cytosquelette pour faciliter la localisation des adhésines vers un pôle de la cellule [32, 33, 35].

Autrefois les mycoplasmes étaient supposés être des bactéries exclusivement extracellulaires qui restaient attachées à la surface des cellules épithéliales. Mais il a été démontré que certaines espèces de mycoplasmes pathogènes sont capables de pénétrer dans les cellules hôtes non phagocytaires. C'est le cas de *M. genitalium*, *M. penetrans*, *M. gallisepticum* et *M. fermentans* [35].

Le contact étroit entre les mycoplasmes (dépourvus de paroi) et la membrane plasmique des cellules hôtes pourrait provoquer une fusion localisée, éventuellement transitoire, entre ces deux types de membranes, ou pourrait induire l'échange de composants membranaires et "l'injection" directe du contenu cytoplasmique des mycoplasmes, incluant les enzymes hydrolytiques, dans le cytoplasme des cellules hôtes [32].

### **I.6.2/ Bases pour la découverte de nouveaux facteurs de virulence chez *M. agalactiae***

Dans le cas de l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae*, lors des infections naturelles, des formes aiguës de la maladie avec des signes cliniques marqués comme l'agalactie sont souvent observées (voir le chapitre suivant), mais des formes chroniques avec des signes cliniques atténués ou absents existent [6, 8]. Cela suggère que les souches de *M. agalactiae* présentent différents degrés de virulence.

Ce fait a été démontré par une étude expérimentale réalisée par Sanchis [36], qui a confirmé que les souches de terrain de *M. agalactiae* peuvent présenter des degrés de virulence variables chez les brebis en lactation. Des souches de *M. agalactiae* ont été isolées dans les Pyrénées Atlantiques à partir de lait de brebis provenant de troupeaux ne présentant pas de signes cliniques d'agalactie. Dans cette étude, quatre souches ainsi isolées (les souches 7783, 7784, 8751 et 9523) ont été comparées à deux autres souches des Pyrénées Atlantiques provenant de troupeaux présentant des signes cliniques sévères (les souches 9512 et P89), dans le but d'évaluer le pouvoir pathogène de ces différentes souches. Six groupes de brebis en lactation ont été inoculés par voie intramammaire avec  $10^8$  bactéries viables de chaque souche. Parmi les quatre souches apparemment avirulentes, deux étaient aussi virulentes que les souches isolées de brebis malades (les souches 8751 et 9523), tandis que les deux autres ont induit des signes cliniques moins sévères, les souches 7783 et 7784.

Un autre exemple est le cas des souches de *M. agalactiae* isolées dans les années 80 en Aveyron : elles sont toutes issues de lait de tank de troupeaux ne présentant aucun signe d'agalactie contagieuse. Elles sont donc réputées avirulentes. Cependant une étude réalisée par Galisson en 2001 [16], qui a injecté par voie intramammaire 9 ml d'une culture, de la souche aveyronnaise 4021, titrant  $10^9$  bactéries / ml, a montré que cette souche est pleinement virulente dans ces conditions.

Pour interpréter ces données, il est intéressant de considérer l'étude suivante : lors d'une reproduction expérimentale de la maladie sur des brebis [42], Tola *et al.* ont testé l'influence de la quantité d'ufc de *M. agalactiae* injectée sur l'expression clinique de l'agalactie contagieuse. Pour cela, les auteurs ont injecté à des brebis en lactation, par voie intramammaire, un mélange de quatre souches virulentes de *M. agalactiae*, les souches NU-2697, SS-440, OR-352 et NU-658. D'après ces observations,  $10^3$  ufc suffisent à induire l'apparition de signes cliniques (dans ces conditions expérimentales). Ceci démontre que l'injection par voie diathélique de faibles quantités de mycoplasmes permet de reproduire la maladie, et compte tenu des connaissances sur *M. agalactiae* au sujet de l'excrétion et de la



transmission (qui seront abordées dans le chapitre suivant), il est raisonnable de penser que les doses contaminantes en conditions naturelles sont faibles également. Or, la quantité de bactéries réputées avirulentes inoculée lors des études de Sanchis ( $10^8$  ufc) [36] et de Galisson ( $9.10^9$  ufc) [16] est respectivement 100.000 et presque 10.000.000 fois plus élevée que la quantité pouvant provoquer des symptômes ( $10^3$  ufc) à partir de souches virulentes : l'énorme quantité de bactéries réputées avirulentes inoculée lors de ces études a parfois pu compenser leur avirulence et, de ce fait, provoquer les symptômes observés.

Il est donc important de noter que, même avec des inoculums ayant des titres élevés, les souches 7783 et 7784 se sont révélées hypovirulentes. Par conséquent, dans des conditions expérimentales plus proches des conditions naturelles, les souches 7783 et 7784 des Pyrénées Atlantiques n'auraient peut être pas induit de signes cliniques du tout. Par extension, il est tentant de penser qu'il en est de même concernant la souche 4021 aveyronnaise et les souches 8751 et 9523 des Pyrénées Atlantiques.

Bien que parmi les souches de *M. agalactiae* différents degrés de virulence aient été observés, les bases moléculaires de ces variations dans le pouvoir pathogène restent encore largement inconnues. La comparaison de souches virulentes avec des souches avirulentes pourrait aboutir à la découverte de facteurs de virulence ou d'avirulence.

### I.7/ Hypervariabilité antigénique

La variabilité antigénique représente la capacité que possède une espèce donnée de modifier les propriétés antigéniques des composants de la surface membranaire, ce qui favorise la colonisation des tissus hôtes et l'échappement au système immunitaire.

Comme les mycoplasmes ne sont pas protégés par une paroi cellulaire rigide, c'est leur membrane plasmique qui entre en contact avec les composants du système immunitaire de l'hôte. Ceci rend les mycoplasmes particulièrement sensibles aux inhibiteurs de croissance et à la lyse par les anticorps et le complément. Cependant, les infections par les mycoplasmes sont habituellement de nature chronique, ce qui montre la déficience fréquente des mécanismes de défense de l'hôte pour éradiquer les mycoplasmes [32]. Ceci suggère que les mycoplasmes possèdent un ou plusieurs systèmes leur permettant d'échapper à la destruction par le système immunitaire de l'hôte.

Il existe chez les mycoplasmes une forte instabilité antigénique au sein des générations issues d'un même clone. Cette instabilité résulte de modifications rapides, aléatoires et réversibles dans la distribution des protéines de surface, apparaissant avec une fréquence

élevée de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  par cellule et par génération pure. Ce phénomène, par sa fréquence, ne peut pas être attribué à de simples hasards de mutations (les fréquences des mutations normales vont de  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$ ) et suppose un déterminisme génétique original [31].

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypervariabilité antigénique ont été élucidés dans quelques espèces de mycoplasmes. Ces mécanismes mettent en général en jeu une famille de gènes multiples. A l'intérieur de cette famille de gènes, les événements qui concourent à la diversification phénotypique d'une population sont de différentes natures, selon l'espèce de mycoplasme considérée.

La plupart de ces antigènes hypervariables consistent en des lipoprotéines exposées à la surface des cellules et liées aux acides gras membranaires. Ces lipoprotéines sont capables de changer spontanément de phase, c'est à dire d'alterner l'expression et la non-expression de la protéine (expression de type ON / OFF). De plus, elles contiennent souvent des séquences répétées et peuvent varier spontanément en taille en changeant le nombre de ces répétitions. En fonction de leur longueur, elles pourraient donc masquer ou démasquer d'autres antigènes de surface [32, 33, 41].

De telles lipoprotéines ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces de mycoplasmes, dont les deux espèces phylogénétiquement proches évoquées précédemment, *M. agalactiae* et *M. bovis*.

*M. bovis*, pathogène des bovins, possède une famille de protéines, les Vsps (variable surface lipoproteins), dont l'expression et la taille varient de façon non coordonnée. Treize cadres de lecture ont été caractérisés sur une région génomique de 16 kb portant le locus *vsp*. Environ 80 % des protéines de la famille des Vsps sont composées de séquences répétées de 6, 8, 10, 11, 12, 26, 84 ou 87 acides aminés. Des délétions ou des additions dans ces régions génèrent des variations de taille des protéines Vsps. Lors de recombinaisons de type site-spécifique au sein du locus *vsp*, des séquences sont inversées ce qui produit le changement de phase ON / OFF en plaçant, ou non, un gène sous la dépendance d'un promoteur de transcription. Un autre mécanisme, original, permettant les variations d'expression de type ON/OFF a été mis en évidence dans le gène *vspA* : l'insertion d'un élément génétique mobile en amont du site d'initiation de la transcription bloque la transcription et donc l'expression de la protéine [24, 33, 48].

Chez *M. agalactiae*, une famille de gènes multiples codant pour de nombreuses protéines de surface variables similaires aux Vsps de *M. bovis*, les Vpmas (Variable proteins of *M. agalactiae*), a été caractérisée dans la souche type PG2.

Les caractéristiques des Vpmas sont les suivantes : il existe 6 gènes *vpma* dans un locus d'environ 10 kb, les lipoprotéines Vpmas possèdent une séquence signal atypique et un site de clivage unique chez les procaryotes, toutes les Vpmas présentent une séquence amino-terminale commune, des variations d'expression de type ON / OFF des Vpmas correspondent à des réarrangements d'ADN dans le locus des gènes *vpma*. En se basant sur la présence de régions 5' non traduites très conservées, des séquences signal et des séquences amino-terminales communes, il a été proposé que la famille des gènes *vpma* représente un système homologue à celui de la famille des gènes *vsp* de *M. bovis*. Les séquences répétées des Vpmas contiennent plus d'acides aminés que les Vsps : elles sont composées de 86, 91 ou 186 acides aminés, mais certaines répétitions sont tronquées [17, 19].

De plus les Vpmas ont en commun avec les Vsps de courtes séquences d'acides aminés impliquées dans l'adhésion de *M. bovis* aux cellules pulmonaires des bovins. Malgré la présence de courtes séquences identiques entre les Vsps et les Vpmas, les séquences codantes des gènes *vpma* et *vsp* sont peu homologues sur la majorité de leur longueur. Cela pourrait jouer un rôle dans la spécificité d'hôte différente entre ces deux espèces.

Une analyse des répertoires des gènes *vpma* de 33 souches de *M. agalactiae* d'origine et de pathogénicité variables a été réalisée par southern blot basé sur l'homologie affectant les régions 5' non traduites et les séquences signal. Cette étude [18] a permis de proposer une classification de ces souches selon la similarité de leur répertoire de gènes *vpma* avec celui de la souche PG2. Pour cela, la sonde A3F a été utilisée : cet oligonucléotide dégénéré s'hybride avec les séquences amino-terminales conservées présentes sur les 6 gènes *vpma*. La classification proposée est basée sur la présence ou l'absence de gènes *vpma* par rapport à la souche PG2, le poids moléculaire des bandes avec lesquelles la sonde A3F s'est hybridée, les éventuelles bandes supplémentaires détectées par cette sonde A3F, et la méthylation de l'ADN. Les southern blot ont montré que quasiment chacune de ces 33 souches possède un profil *vpma* qui lui est propre. Dans le tableau 4 (Chapitre Matériels et Méthodes, 2<sup>ème</sup> Partie), les souches de *M. agalactiae* sont classées selon les résultats de cette étude, la souche 7327 possédant le répertoire de gène *vpma* le plus proche de la souche type PG2, et la souche 8062 possédant le répertoire le plus divergent de celui de la souche PG2.

### I.8/ Hétérogénéité intraspécifique

La variabilité intraspécifique se caractérise par des différences antigéniques, génétiques, et protéiques parmi des souches ou des isolats d'une même espèce [4].

### **I.8.1/ Hétérogénéité antigénique**

La variabilité antigénique chez les mycoplasmes vient d'être évoquée. Chez *M. agalactiae*, les Vpmas représentent une variabilité à l'échelon intraclonal, c'est à dire au sein des générations issues d'un même clone.

Par ailleurs, à l'échelon intraspécifique, la distribution de certains déterminants antigéniques est hétérogène au sein des souches de *M. agalactiae*. L'utilisation combinée de trois anticorps monoclonaux, 1D4, 2B12 et SA1, a permis de définir huit sérotypes parmi les souches de *M. agalactiae* : les sérotypes A, B, C, D, E, F, G et H. Les souches de sérotype A, B, C ou D possèdent un épitope reconnu par l'anticorps 1D4, alors que les souches de sérotype E, F, G ou H ne sont pas reconnues par 1D4 (voir p 67). Les souches de sérotype E, F, G ou H sont beaucoup plus rares que les souches de sérotype A, B, C ou D [4, 5].

### **I.8.2/ Hétérogénéité génomique**

L'intérêt général chez les mycoplasmes de l'analyse des profils de restriction de l'ADN chromosomique est d'évaluer le degré d'hétérogénéité génomique des souches au sein d'une même espèce. L'importance de la variabilité génomique intraspécifique chez les mycoplasmes, abordée par cette méthode, dépend de l'espèce étudiée. *M. synoviae* et *M. pneumoniae* présentent un degré de variabilité limité, alors que les souches de *M. ovipneumoniae* sont très hétérogènes [4].

Chez *M. agalactiae*, une étude de Bergonier [4] portant sur 33 souches a permis de déterminer un profil majeur regroupant 65 % des souches et plusieurs profils de restriction originaux, ce qui a mis en évidence l'existence d'une hétérogénéité génomique certaine chez *M. agalactiae*. De même des tests d'hybridation ADN / ADN ont démontré l'existence d'une telle hétérogénéité au sein de l'espèce *M. agalactiae*.

### **I.8.3/ Hétérogénéité protéique**

Chez les mycoplasmes, le degré de variabilité protéique évaluée en SDS-PAGE (Electrophorèse des protéines cellulaires en Gel de PolyAcrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate) unidimensionnelle présente une ampleur variable en fonction des espèces. *M. bovis* est une espèce relativement homogène, par contre les souches de *M. capricolum* sp. *capricolum* sont très hétérogènes de ce point de vue [4].

Chez *M. agalactiae*, une étude de Bergonier [4] portant sur les profils électrophorétiques de 51 souches a montré des différences nettes entre certains isolements, ce qui implique une forte hétérogénéité protéique intraspécifique.

<b>Formes dominantes</b>	ovins : subaiguës à chroniques caprins : aiguës à chroniques
<b>Mortalité</b>	
Adultes (hors lactation)	ovins, caprins : 0-3 %
Femelles en lactation	ovins : 0-10 % caprins : 0-40 %
Jeunes	ovins : 1-10 % caprins : 3-50 %
<b>Morbidité</b>	
Adultes	ovins, caprins : 0-20 %
Femelles en lactation	ovins : 1-50 % caprins : 10-90 %
Jeunes	ovins : 2-60 % caprins : 10-70 %
<b>Syndromes typiques</b>	
Adultes	articulaire > oculaire >> respiratoire
Femelles en lactation	mammaire >> articulaire > oculaire > avortements > respiratoire
Jeunes	respiratoire, articulaire, oculaire, formes septicémiques possibles
<b>Formes atypiques</b>	respiratoires, génitales

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques de l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* chez les ovins et les caprins [8].

## II/ L'AGALACTIE CONTAGIEUSE A *MYCOPLASMA AGALACTIAE*

### II.1/ Etiologie

Le syndrome agalactie contagieuse regroupe plusieurs symptômes provoqués par quatre espèces de mycoplasmes. *M. agalactiae* est le principal agent responsable de l'agalactie contagieuse. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony (*MmmLC*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* et *Mycoplasma putrefaciens* provoquent des symptômes similaires. *M. agalactiae* atteint principalement les ovins. Les caprins sont majoritairement infectés par *MmmLC*, *M. capricolum capricolum* et *M. putrefaciens* [6].

Dans la présentation qui suit, nous traiterons uniquement l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae*.

### II.2/ Clinique

Le tableau 3 récapitule les caractéristiques cliniques de l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* chez les ovins et les caprins [6, 8].

Les formes typiques peuvent débuter par un bref syndrome fébrile accompagnant une bactériémie. La phase d'état représente une étape de localisation de l'agent infectieux dans les trois organes cibles principaux : la mamelle, les articulations et l'œil.

L'atteinte quasi-systématique de la mamelle est bien souvent la première et parfois la seule constatée chez les femelles en lactation. Les symptômes mammaires sont au moins fonctionnels, allant de l'hypogalactie passagère à l'agalactie brutale, accompagnée de mammites.

Les poly- arthrites, moins fréquentes, touchent surtout les carpes et les tarses des jeunes ovins et sont à l'origine de boiteries pouvant aller jusqu'à l'ankylose et le décubitus.

Les kérato- conjonctivites peuvent être observées chez les femelles en lactation, chez les adultes hors lactation ainsi que chez les jeunes.

Moins fréquemment, des avortements peuvent survenir, ainsi que de la diarrhée. Il est relativement rare d'observer une symptomatologie respiratoire chez les adultes. Les pneumonies sont en revanche plus fréquentes chez les jeunes, ainsi que les septicémies.

Des formes partielles ou frustes peuvent exister.

### II.3/ Répartition géographique et évolution dans un troupeau atteint [6, 8]

Les cinq continents sont touchés par le syndrome agalactie contagieuse avec une prédominance de la maladie autour du bassin Méditerranéen et en Europe Orientale.

En France, deux zones, les Pyrénées Atlantiques et la Savoie, constituent d'anciennes régions d'enzootie à *Mycoplasma agalactiae*. L'infection est actuellement circonscrite à quelques vallées ou quelques estives. Dans ces zones, l'infection à *M. agalactiae* est caractérisée par une très forte persistance entrecoupée d'importantes flambées épizootiques.

L'évolution de l'incidence dans un troupeau est très variable. La maladie peut survenir soudainement dans un troupeau ou affecter successivement un nombre limité d'animaux.

L'évolution de la prévalence dépend essentiellement du stade physiologique des femelles et des mouvements d'animaux. On peut donc identifier trois périodes physiologiques et saisonnières de prévalence clinique maximale : la mise bas, la mise à la traite et la période estivale de transhumance.

La persistance clinique à l'échelon du troupeau est généralement de l'ordre de plusieurs mois en l'absence d'intervention (abattage, antibiothérapie, vaccination). La maladie peut récidiver cliniquement lors des lactations suivantes. En zone d'enzootie, l'évolution pluriannuelle peut consister en l'atteinte clinique quasi-exclusive des jeunes à la mamelle ou des primipares, qui présentent alors des arthrites. La persistance asymptomatique de l'infection mammaire et de l'excrétion atteint plusieurs années après l'épisode clinique initial.

### II.4/ Sources de contamination et modes de transmission [6, 8]

Etant donnée la grande fragilité des mycoplasmes, les sources animales jouent un rôle prépondérant par rapport aux sources environnementales. Ceci explique la forte persistance et la chronicité de l'infection à *M. agalactiae*.

#### **II.4.1/ Les sources de contamination**

- Les animaux malades :

Lors de la maladie clinique, l'excrétion est abondante et diversifiée : lait, larmes, sécrétions ou jetage respiratoires, fèces, urine, produit pathologique articulaire, sécrétions utéro vaginales et génitales mâles. Les dénombrements dans le lait peuvent révéler plus de  $10^9$  ufc/ml [4].

- Le portage postclinique :

Une des sources majeures est l'excrétion galactophore, pouvant excéder plusieurs mois. Elle constitue un des facteurs essentiels du maintien de l'infection au sein d'un effectif.

Les mycoplasmes peuvent persister longuement dans d'autres sites : appareils respiratoire et digestif, articulations, culs de sac conjonctivaux, etc.

- Le milieu extérieur :

Les mycoplasmes ne sont pas aptes à une longue survie dans le milieu extérieur : une estimation de la durée de survie dans des conditions proches du terrain est de sept jours ; mais l'environnement peut constituer, de manière transitoire, un réservoir de germes.

#### **II.4.2/ Les modes de transmission**

Les principales voies de contamination sont orales (abreuvoirs et mangeoires communs, tétée), respiratoires (contacts étroits entre animaux et tétée) et mammaires (dépôt de mycoplasmes sur le trayon lors de la traite mécanique ou manuelle).

La voie orale est considérée comme une voie majeure de contamination.

La voie mammaire a un rôle très important dans les systèmes laitiers.

Une pénétration oculaire faisant suite à des contacts étroits, à l'émission d'aérosols infectieux ou à l'instillation accidentelle de particules infectées peut être mise en cause.

#### **II.5/ Diagnostic [7, 8]**

Les données épidémiologiques permettent en général d'établir une suspicion d'agalactie contagieuse, mais le recours à un diagnostic étiologique au laboratoire est systématique.

##### **II.5.1/ Diagnostic étiologique**

Le prélèvement de choix est le lait, individuel ou de tank. Les prélèvements oculaires, synoviaux ou respiratoires sont également intéressants.

La culture des mycoplasmes étant lente et difficile, les résultats sont tardifs. De plus l'identification est délicate.

La technique d'immunoempreinte sur membrane de filtration (dot immunobinding) permet de s'affranchir de l'hétérogénéité intraspécifique de *M. agalactiae*, aux plans



protéiques et génomiques. Le principe de ce test réside dans la filtration de cultures au travers d'une membrane qui retient les cellules mycoplasmiques, identifiées ensuite au moyen d'antisérums polyclonaux hyperimmuns spécifiques.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) représente la technique la plus prometteuse pour l'identification directe des mycoplasmes à partir d'échantillons de lait, ce qui permettrait de s'affranchir de leur culture difficile. Le principal problème est posé par la complexité de la composition du lait (risque de résultats faussement négatifs).

### **II.5.2/ Diagnostic sérologique**

Le diagnostic de l'agalactie contagieuse repose essentiellement sur les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), basés sur des antigènes totaux, plus spécifiques et plus sensibles que les tests utilisant la fixation du complément.

Les techniques ELISA sont principalement utilisées pour le dépistage à l'échelle du troupeau, lors de suspicions cliniques, de transactions commerciales ou d'enquêtes séro-épidémiologiques. En région infectée, l'élaboration annuelle d'un indice sérologique de troupeau est en France l'outil fondamental de qualification des cheptels, permettant une gestion de leurs mouvements.

## **II.6/ Traitement - Prévention**

### **II.6.1/ Traitement**

Les traitements anti-mycoplasmes reposent sur l'utilisation d'antibiotiques présentant les caractéristiques suivantes : activité sur les bactéries dépourvues de paroi, bonne persistance plasmatique, bonne diffusion tissulaire, grande capacité à passer du compartiment sanguin vers la mamelle, voire de s'y concentrer, et concentrations minimales inhibitrices faibles. Les principales molécules utilisables sont donc les macrolides (tiamuline), les tétracyclines, le florfenicol, et les fluoroquinolones. De plus, l'antibiothérapie doit être facile à mettre en œuvre compte tenu des effectifs souvent importants [4, 8].

Les objectifs principaux des traitements antibiotiques sont d'empêcher la mortalité, surtout en ce qui concerne les caprins, d'améliorer l'état des malades, voire d'atteindre la guérison clinique et la reprise de la lactation.

Or le rapport coût / efficacité du traitement se révèle en général décevant. Le traitement ne permet le plus souvent qu'une amélioration de l'état des malades et peut, de plus, favoriser l'émergence de porteurs chroniques asymptomatiques, constituant une source

pérenne de mycoplasmes. La guérison bactériologique, qui est un objectif théorique, n'est pas atteinte en pratique avec les traitements antibiotiques.

### **II.6.2/ Prévention**

Etant donnée l'efficacité médiocre des vaccins disponibles, la vaccination a officiellement cessé en France en 1988. Les perspectives d'amélioration vaccinale restent lointaines. Restent donc les mesures de prophylaxie sanitaire.

En France, trois départements ont opté pour une prophylaxie purement sanitaire : les Pyrénées Atlantique, la Savoie et la Haute-Savoie. La question de la vaccination ne se pose donc pas, d'autant que les anticorps vaccinaux amèneraient à une positivation de l'indice sérologique.

Le programme de maîtrise sanitaire développé dans les Pyrénées Atlantiques repose sur : [8]

- la déclaration obligatoire des suspicions cliniques et la confirmation au laboratoire,
- la qualification annuelle exhaustive des troupeaux par la sérologie ELISA principalement,
- l'incitation à l'abattage total et au renouvellement subventionnés (à défaut isolement strict),
- la gestion des transactions et des mouvements de troupeaux en fonction des qualifications et de sérologies supplémentaires pour les achats.

Les mesures sanitaires sont efficaces pour diminuer progressivement la prévalence de l'agalactie contagieuse, mais ensuite il devient de plus en plus difficile de progresser vers l'éradication. Des études sont en cours en vue d'améliorer le dépistage sérologique et le diagnostic étiologique (recherches sur la mise au point de PCR sur lait de tank), ce qui renforcerait les mesures prophylactiques.

En contraste avec l'abondance des données cliniques (observations de terrain et reproductions expérimentales de la maladie) concernant l'agalactie contagieuse, nous n'avons presque aucune connaissance fondamentale sur cette pathologie et son agent, ce qui handicape la mise au point de stratégies de lutte originales. Les exemples suivants illustrent ce manque de connaissances.

Un des points les plus importants concerne la physiopathologie de l'agalactie contagieuse : nous ne savons pas comment *M. agalactiae* provoque les symptômes observés.

D'autre part, du point de vue immunologique, nous savons que les mycoplasmes sont capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte [33], ce qui leur permet d'échapper ou de supprimer les mécanismes de défense de l'hôte et d'établir une infection persistante, chronique, mais les substances synthétisées par les mycoplasmes, susceptibles d'être impliquées dans ce phénomène, ne sont que très peu connues. De plus, nous ne savons pas s'il existe des localisations préférentielles des mycoplasmes dans l'organisme de l'hôte leur permettant d'échapper physiquement au contact avec le système immunitaire. Concernant *M. agalactiae*, quelques rares pistes tentent d'expliquer ces phénomènes. En particulier, le système antigénique hypervariable codé par les gènes *vpma* pourrait participer à l'échappement à la réponse immunitaire. La localisation de *M. agalactiae* au cours de l'infection et la colonisation de différents organes pourraient être contrôlées par des adhésines ; une seule protéine candidate pour ce rôle a été décrite à ce jour, il s'agit de l'adhésine P40, qui permet l'attachement de *M. agalactiae* à la membrane des cellules hôtes, étape indispensable à l'infection [14].

Par ailleurs les co-infections ne sont pas exceptionnelles, en particulier chez les caprins : les associations de mycoplasmes responsables de l'agalactie contagieuse peuvent être mises en évidence à l'intérieur d'un même élevage atteint ou à partir d'un même animal malade (il s'agit le plus souvent d'une association *M. agalactiae* avec *MmmLC*), mais nous ne possédons pas de données sur d'éventuelles interactions entre mycoplasmes lors de co-infection : les mycoplasmes agissent-ils en synergie, s'échangent-ils des gènes, des facteurs de virulence ? Ce type de phénomène est suggéré chez *M. pulmonis* [39] mais n'a pas été démontré chez *M. agalactiae*.

Il est donc devenu nécessaire d'identifier de nouveaux composants impliqués dans le pouvoir pathogène de *M. agalactiae*. Dans ce but, une approche globale, sans *a priori*, a été utilisée au cours de ce travail : la comparaison de génomes de souches présentant des degrés de virulence différents par la technique d'hybridation soustractive suppressive.

## **2<sup>ème</sup> Partie : Etude expérimentale**



## I/ PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Notre but est donc de mettre en évidence et de caractériser les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *M. agalactiae*. Une approche classique chez les bactéries pour explorer leur virulence est de provoquer une mutagenèse aléatoire, suivie du criblage des mutants pour isoler ceux ayant perdu tout ou partie de leur virulence, puis de compléter les mutations.

Or cela n'est pas réalisable dans notre cas car il n'existe pas à ce jour d'outil génétique permettant d'effectuer cette approche chez *M. agalactiae*. Des hypothèses *a priori* sont donc émises sur la pathogénicité, par exemple impliquant les Vpmas, le peroxyde d'hydrogène, ou les adhésines, et doivent ensuite être vérifiées, mais de cette façon il n'est pas possible d'identifier l'ensemble des déterminants de la pathogénicité.

Dans ce travail de thèse, nous avons donc décidé de comparer le génome d'une souche virulente de *M. agalactiae* à celui d'une souche non virulente de cette espèce, afin de rechercher, globalement, les bases génétiques du pouvoir pathogène de la souche virulente.

### I.1/ La méthode utilisée : l'hybridation soustractive suppressive

L'analyse comparative du génome de deux bactéries proches peut être réalisée grâce à différentes techniques, notamment l'hybridation soustractive. Cette méthode utilise la soustraction et l'enrichissement cinétique afin de purifier des fragments d'ADN, issus de l'action d'enzymes de restriction, présents dans un seul des deux génomes. L'hybridation soustractive, qui peut participer à la découverte de nouveaux marqueurs d'épidémiologie moléculaire ou de déterminants de la spécificité à un hôte, permet également d'identifier des éléments génétiques mobiles ou séquences d'insertion, des îlots de pathogénicité, et peut être utilisée pour étudier des variations dans l'expression de gènes, tous ces éléments pouvant être impliqués dans la virulence d'une souche [47].

L'hybridation soustractive est un bon complément au séquençage de génomes entiers car elle permet une analyse rapide et directe des différences entre deux génomes.

Une variante de cette technique appelée hybridation soustractive suppressive (HSS) a permis de comparer plusieurs souches de la bactérie *Helicobacter pylori* [2]. Cette variante, remarquablement simple à utiliser, a ensuite été appliquée à de nombreuses bactéries pathogènes.

Au laboratoire de biologie moléculaire des mycoplasmes de l'UMR 1225 INRA-ENVT, la technique d'hybridation soustractive suppressive a été utilisée avec succès pour

comparer la souche type de *M. agalactiae*, PG2, à une souche de terrain virulente de cette espèce, la souche 5632 [26], ainsi que les souches type de *M. agalactiae* et de *M. bovis*, PG2 et PG45 [27]. La comparaison d'une souche pathogène avec une souche non pathogène n'avait jamais été testée.

## I.2/ Choix des souches comparées

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi la souche type PG2 de *M. agalactiae* comme modèle de souche virulente. En effet cette souche, isolée en Espagne en 1931 à partir d'animaux présentant les signes cliniques de l'agalactie contagieuse, est bien référencée et est souvent utilisée lors d'études comparatives.

Nous avons vu que les souches aveyronnaises de *M. agalactiae* sont réputées avirulentes. Or une étude réalisée en 2001 [16] a mis en évidence le pouvoir pathogène d'une de ces souches, la souche 4021 ; et à ce jour, aucune étude expérimentale n'a confirmé l'avirulence des souches aveyronnaises de *M. agalactiae*. Nous n'avons donc pas sélectionné une telle souche dans notre étude comme modèle de souche avirulente.

La souche 7784 est la seule souche de *M. agalactiae* en notre possession pour laquelle une hypovirulence a été démontrée, même avec de fortes doses inoculées [36]. Nous avons donc choisi de comparer cette souche à la souche PG2.

## **II/ PRINCIPE DE LA TECHNIQUE UTILISEE : L'HYBRIDATION SOUSTRACTIVE SUPPRESSIVE [11]**

L'hybridation soustractive est une méthode puissante qui a été appliquée à la recherche dans de nombreux domaines. Lors d'études de systèmes eucaryotes, l'application des techniques de soustraction se focalise sur les différences d'expression des gènes (différences entre deux populations d'ADNc) plus que sur les différences entre deux génomes. En effet, les génomes eucaryotes sont trop complexes pour les techniques classiques de soustraction. Par contre, les génomes bactériens sont bien plus petits, et moins complexes que beaucoup de populations d'ADNc eucaryotes. Ainsi les méthodes de soustraction peuvent être utilisées pour identifier des séquences présentes dans un génome bactérien mais absentes dans un autre.

Bien qu'il existe plusieurs méthodes différentes, la théorie de base de la soustraction est simple. L'échantillon d'ADN génomique qui contient les séquences d'intérêt est appelé Tester, l'échantillon de référence est appelé Driver. Les techniques classiques sont basées sur la séparation physique des fragments afin de récupérer les fragments spécifiques au Tester. Ceci pose parfois des problèmes de contamination des fragments purifiés par de l'ADN Driver, générant ainsi des faux-positifs.

Le principe de certaines hybridations soustractives comme l'hybridation soustractive suppressive est d'hybrider les ADN Tester et Driver puis d'amplifier les homoduplex Tester-Tester par PCR (Polymerase Chain Reaction), cette amplification étant exponentielle. Le milieu se retrouve ainsi enrichi en homoduplex Tester-Tester, les hétéroduplex Tester-Driver étant minoritaires.



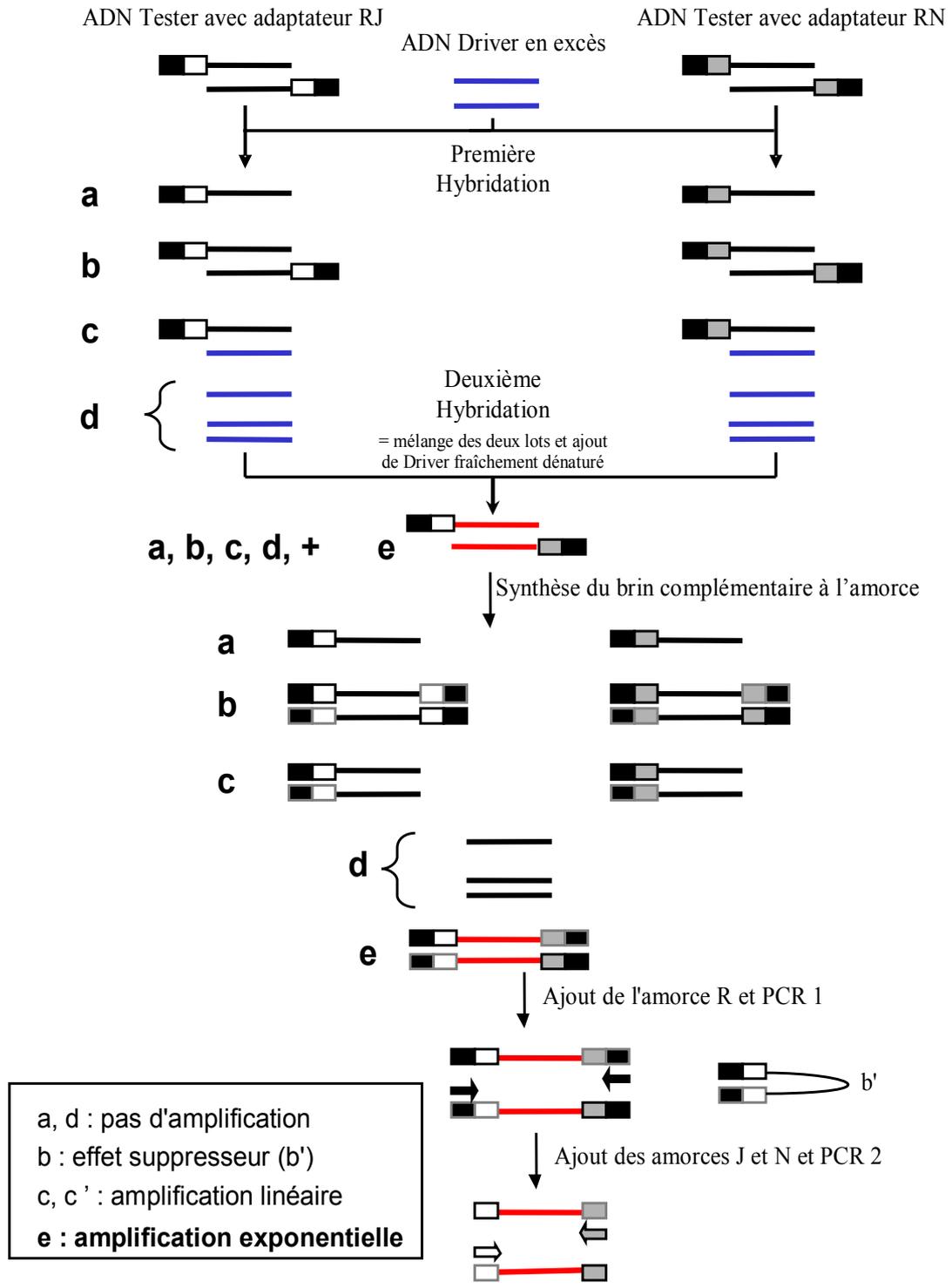


Figure 1 : Principe de l'Hybridation Soustractive Suppressive

La figure 1 détaille les événements qui ont lieu lors de l'hybridation soustractive suppressive (HSS) de deux génomes bactériens.

## II.1/ Digestion et ligation de l'ADN

Tout d'abord, l'ADN génomique des deux souches bactériennes à comparer est extrait (1,5 à 2 µg d'ADN sont nécessaires par soustraction). Ces ADN Tester et Driver sont digérés par une enzyme de restriction coupant fréquemment. L'ADN Tester est alors divisé en deux lots (1 et 2), et chacun est lié avec un adaptateur différent (adaptateurs 1 et 2). Les extrémités de ces adaptateurs ne sont pas phosphorylées, ainsi seule l'extrémité 3' du brin long de chaque adaptateur s'attache de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN. Les deux adaptateurs possèdent une séquence commune de 24 nucléotides, "R", et une séquence spécifique de 24 nucléotides, "N" ou "J" selon l'adaptateur (voir le chapitre III : Matériels et Méthodes).

## II.2/ Deux hybridations sont ensuite réalisées

- Pour la première hybridation, un excès de Driver est ajouté à chaque lot de Tester lié à un adaptateur. Ces ADN sont ensuite dénaturés par la chaleur et peuvent s'hybrider, formant des molécules de type **a**, **b**, **c** et **d**.

Les molécules de type **a**, simple brin, sont significativement enrichies en séquences spécifiques au Tester, alors que les fragments non spécifiques au Tester forment les molécules de type **c** avec l'ADN Driver.

La fraction d'ADN Tester simple brin (molécules **a**) est normalisée, autrement dit les fragments en copie unique et ceux en copie multiple dans le génome bactérien Tester se retrouvent approximativement à la même concentration. En effet, la réhybridation est plus rapide pour les molécules les plus abondantes. Les copies multiples réhybridées forment les molécules de type **b**.

Les molécules de type **d** sont des séquences de l'ADN Driver en excès, simple ou double brin, ne possédant pas d'adaptateur.

- Pour la deuxième hybridation, les lots 1 et 2 issus de la première hybridation sont mélangés sans être dénaturés. Ceci assure que seules les molécules simple brin d'ADN Tester de type **a** peuvent s'associer pour former des molécules **b**, **c** et surtout un nouveau type de molécules **e** hybrides. Ces nouveaux hybrides ont une caractéristique importante : ce sont des molécules Tester double brin possédant deux extrémités 5' différentes, une provient du lot 1

et l'autre du lot 2. Les extrémités correspondent donc aux séquences des adaptateurs 1 et 2. De l'ADN Driver fraîchement dénaturé est ajouté (sans dénaturer le mix de soustraction) afin d'enrichir la portion **e** en séquences spécifiques au Tester.

Après qu'une ADN polymérase ait complété les extrémités, les molécules de type **e** possèdent à leurs extrémités 3' et 5' des sites d'hybridation pour les amorces partiellement différents. La séquence de l'amorce qui sera utilisée lors de la première PCR est identique à une partie de l'adaptateur (il s'agit de la séquence "R"). L'amorce s'hybridera donc sur la partie complémentaire à l'adaptateur, synthétisée par l'ADN polymérase.

### II.3/ Amplification par PCR

La population totale des molécules **a**, **b**, **c**, **d** et **e** est soumise à une PCR nichée afin d'amplifier les séquences spécifiques au Tester.

- Une première PCR est réalisée. Les molécules de type **a** et **d** ne possèdent pas de site d'hybridation pour l'amorce, et ne peuvent donc pas être amplifiées (car absence de séquence complémentaire à l'adaptateur). Chaque brin d'ADN des molécules **b** possède des séquences complémentaires à ses extrémités et forme une structure stable en épingle à cheveux après chaque étape de dénaturation / hybridation de la PCR. Les molécules **b** ne sont donc majoritairement pas amplifiées. Les molécules de types **c** possèdent un seul site d'hybridation pour l'amorce et ne peuvent donc être amplifiées que linéairement.

Seules les molécules de type **e**, normalisées et enrichies en séquences spécifiques au Tester, possèdent deux sites d'hybridation pour l'amorce et peuvent être amplifiées de façon exponentielle. Ces molécules ne peuvent pas former de structure en épingle à cheveux car la taille de la partie commune aux deux adaptateurs (la partie "R", de 24 nucléotides) n'est pas assez importante pour permettre la stabilité d'une telle structure (à moins que les molécules **e** aient une taille inférieure à environ 200 pb).

- Ensuite, une deuxième PCR est réalisée en utilisant les amorces nichées ("N" et "J") afin d'enrichir le milieu en séquences spécifiques au Tester.

L'ADN soustrait peut ensuite être directement cloné dans un vecteur plasmidique. La spécificité des fragments clonés peut être testée par southern blot et les fragments d'intérêt sont séquencés.

### III/ MATERIELS ET METHODES

#### III.1/ Les souches

Les souches de mycoplasmes utilisées dans cette étude proviennent de la collection de F. Poumarat de l’AFFSA Lyon et sont présentées dans les tableaux 4 et 5. Le tableau 4 comporte 33 souches de *M. agalactiae* de provenances diverses dont la souche type PG2, et la souche type de *M. bovis*, PG45. Ces souches seront regroupées sous le nom de "sous-collection A". Le tableau 5 présente 46 souches de *M. agalactiae* isolées dans les Pyrénées Atlantiques ; ces souches seront regroupées sous le nom de "sous-collection B".

L’identification de l’espèce *agalactiae* de ces isolats a été réalisée par la technique d’immunoempreinte sur membrane de filtration [30] à l’aide d’anticorps spécifiques de lapin à l’AFFSA Lyon. Des western blot ont été réalisés avec des préparations de protéines totales de mycoplasmes et en utilisant l’anticorps monoclonal 1D4 [5] pour déterminer le sérotype de chaque souche. Les cultures des souches de mycoplasmes sont réalisées en milieu liquide SP-4 [44] ou en milieu liquide Aluotto [3], à 37°C.

La souche d’*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) est cultivée dans du milieu LB (extrait de levure Difco 0,5 % ; tryptone Difco 1 % ; NaCl 0,5 %) supplémenté avec de l’ampicilline (1  $\mu$ g/ml).

#### III.2/ Les oligonucléotides

Tous les oligonucléotides utilisés pour la production d’adaptateurs pour les ligations et en tant qu’amorces pour les PCR proviennent d’Invitrogen. La sonde A3F est utilisée pour les southern blot : cet oligonucléotide dégénéré peut s’hybrider avec une séquence conservée présente sur les 6 gènes *vpma*. Les séquences des oligonucléotides figurent dans le tableau 6.

Lors de la construction des adaptateurs, un oligonucléotide de 48 bases est hybridé avec un oligonucléotide de 12 bases. Ces hybridations ont été effectuées selon les recommandations du fabricant. Les adaptateurs RJbam et RJblunt sont construits par les hybridations du nucléotide RJ48 aux nucléotides Jbam12 et Jblunt12 respectivement. Les adaptateurs RNbam et RNblunt sont construits par les hybridations du nucléotide RN48 aux nucléotides Nbam12 et Nblunt12 respectivement. Ces adaptateurs sont schématisés dans la figure 2.

Les adaptateurs RJbam et RNbam possèdent des bouts cohésifs alors que les adaptateurs RJblunt et RNblunt possèdent des bouts francs.

Souche	Pays	Source	Hôte	Année	Nombre de gènes <i>vpma</i> manquants	1D4
<b>PG2 type</b>	<b>Espagne</b>		<b>caprin</b>	<b>1931</b>	<b>0</b>	<b>+</b>
7327	Grèce	lait	caprin	1987	0	+
332	France PA	articulation	ovin	1998	0	+
<b>7784</b>	<b>France PA</b>	<b>lait</b>	<b>ovin</b>	<b>1994</b>	<b>0</b>	<b>+</b>
9600	Portugal	lait	caprin	≤1996	0	+
5210	France	lait		1988	0	+
9385	Portugal	lait	caprin	≤1996	0	+
5225	Espagne	lait	caprin	1991	0	+
9875	Espagne	lait	ovin	≤1996	0	+
7314	Grèce	lait	ovin	1986	0	+
5670	Espagne	lait	ovin	1991	0	+
5725	France PA	lait	ovin	1990	0	+
4021	France Av	lait	ovin	1988	0	+
6833	Italie	lait	caprin	1993	0	+
8750	France PA	lait	ovin	1995	0	+
5826	Espagne	lait	ovin	1992	0	+
6968	Espagne	lait	ovin	1993	0	+
009	Sardaigne	lait	ovin		1	+
7169	Suisse	lait	caprin	≤1993	1	+
7375	Suisse	lait	caprin	≤1993	1	+
190 Vacc	Roumanie			1951	1	+
4210	France	lait	caprin	1982	2	+
4258	France	lait	caprin	1989	2	+
8064	Côte d'Ivoire	poumon	ovin	1989	3	-
4025	France Av	lait	ovin	1988	3	+
209	France	lait	caprin	1983	3	-
5632	Espagne	articulation	caprin	1991	4	-
4054	France	lait	caprin	1986	4	-
4212	France	lait		1986	4	-
3990	France			≤1984	5	-
4055	France	lait	caprin	1987	5	-
8063	Turquie			1988	6	-
8062	Ethiopie	poumon	caprin	1987	6	-
PG45 type	<i>M. bovis</i>		bovin		6	ND

**Tableau 4** : Souches de mycoplasme utilisées, sous-collection A.

Ce tableau présente 33 souches de *M. agalactiae* dont la souche type PG2 et la souche 7784 qui ont été comparées dans cette étude par la technique d'hybridation soustractive suppressive, ainsi que la souche type de *M. bovis* PG45.

Le nombre de gènes *vpma* manquants par rapport au répertoire de gènes *vpma* de la souche type PG2 est indiqué [18].

1D4 = anticorps monoclonal dont la réactivité a été testée par western blot. ND = non déterminé

Case vide = information non connue

Ces souches sont classées dans ce tableau en fonction de la similarité de leurs répertoires *vpma* par rapport à la souche PG2. [18].

Souche	Année	Souche	Année	Souche	Année	Souche	Année
--------	-------	--------	-------	--------	-------	--------	-------

4206	1981	5691	≤ 1991	7786	1994	9508	1994
5274	1983	5725	1990	8751	1995	9509	1994
5275	1983	5728	≤ 1991	8754	1995	9511	1994
5276	1977	5729	≤ 1991	8782	1995	9512	1995
5633	≤ 1991	5730	≤ 1991	9419	1993	9523	1995
5635	1990	5770	≤ 1991	9420	1993	9807	1995
5636	≤ 1991	5771	≤ 1991	9502	1993	9808	1995
5638	≤ 1991	7780	1994	9503	1993	9809	1995
5639	≤ 1991	7781	1994	9504	1993	9810	1995
5648	≤ 1991	7782	1994	9506	1994	9871	1995
5689	≤ 1991	7783	1994	9507	1994	9872	1995
5690	≤ 1991	7784	1994				

Tableau 5 : Souches de *M. agalactiae* des Pyrénées Atlantiques utilisées, sous-collection B.

L'année d'isolement de ces souches est indiquée. Ces souches ont toutes été isolées à partir d'échantillons de lait de brebis. L'anticorps monoclonal 1D4 reconnaît l'ensemble de ces souches.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence
RJ48	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAGACCGACGTCGACTATCCATGAACG
RN48	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAGAGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG
Jbam12	GATCCGTTTCATG
Jblunt12	CGTTCATGGATA
Nbam12	GATCCTCCCTCG
Nblunt12	CTCCCTCGGATA
R24	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG
J24	ACCGACGTCGACTATCCATGAACG
N24	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG
A3F	AA(A/G)TG(T/C)GG(A/T)GG(A/T)AC(A/T)A(A/C)(A/T)(A/G)A

Tableau 6 : Les oligonucléotides utilisés.

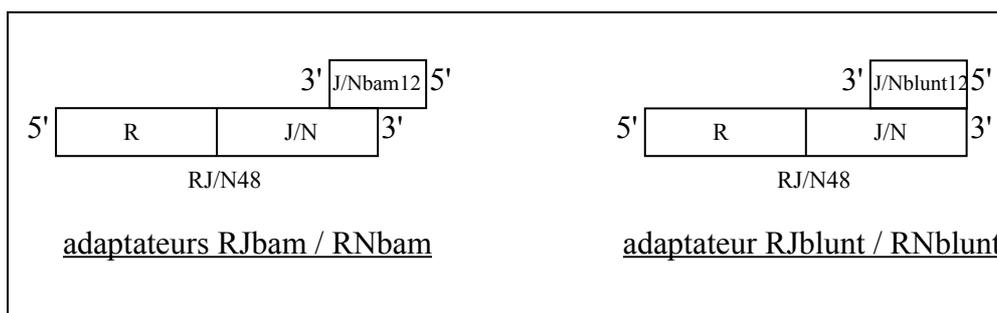


Figure 2 : Adaptateurs schématisés.

En fonction des oligonucléotides J ou N les adaptateurs RJbam ou RNbam et RJblunt ou RNblunt sont synthétisés.

### III.3/ Les techniques de biologie moléculaire

Les PCR (Polymerase Chain Reaction) sont réalisées dans un thermocycler MJResearch PT100, avec la Taq polymérase recombinante ou la Taq Platinum (Invitrogen). Le tampon de réaction provient d'Invitrogen.

Les produits de la PCR nichée sont éventuellement purifiés selon le protocole du kit "Wizard PCR Preps DNA purification system" de chez Promega.

Le plasmide pGEM-T easy (Promega) est utilisé pour cloner les produits de PCR dans *E. coli* DH5 $\alpha$  selon les recommandations du fabricant.

Les réactions de ligation sont effectuées avec le système "LigaFast ligation" de chez Promega.

Les préparations des plasmides en vue du séquençage sont effectuées grâce au kit "Wizard Plus SV Miniprep DNA purification system" de chez Promega.

Le séquençage des plasmides est réalisé par Genome-Express (Meylan, France).

### III.4/ Les préparations d'ADN

Pour les soustractions, les ADN génomiques Tester et Driver de *M. agalactiae* sont préparés comme suit : 1 ml de culture starter en milieu SP-4 est inoculé dans 30 ml du même milieu pour permettre la croissance jusqu'à la phase semi-logarithmique.

Les cultures des souches PG2 et 7784 sont centrifugées à 14000g pendant 30 min à 4°C, puis lavées deux fois dans du PBS stérile à pH 7,4. Les culots des cellules sont resuspendus dans 500  $\mu$ l de tampon A (Tris pH8,0 10 mM ; EDTA 10 mM ; NaCl 10 mM) puis incubés toute la nuit à 37°C avec 25  $\mu$ l de SDS 10 % et 5  $\mu$ l de protéinase K 20 ng/ml (Eurobio).

Après ajout de 5  $\mu$ l de RNaseA DNase free Boehringer et incubation de 30 min à 37°C, une étape d'extraction est effectuée en ajoutant 500  $\mu$ l de phénol équilibré avec du tampon B (Tris pH8,0 500 mM ; EDTA 10 mM ; NaCl 10 mM) et en agitant doucement pendant 10 min à température ambiante. Les tubes sont ensuite brièvement refroidis dans la glace puis centrifugés 1 min à 12000 g. La phase organique est éliminée.

La dernière étape est répétée deux fois avec 500  $\mu$ l de phénol équilibré avec du tampon B / chloroforme / isoamyl alcool 25/24/1, puis deux fois avec 500  $\mu$ l de chloroforme / isoamyl alcool 24/1.

Les ADN sont récupérés après précipitation par l'éthanol à 100 % en présence de 0,25M NaOAc (concentration finale), puis sont lavés deux fois dans de l'éthanol à 70 %, séchés et resuspendus dans 400 µl d'eau.

### III.5/ L'Hybridation Soustractive Suppressive (HSS)

La technique d'hybridation soustractive suppressive adaptée à l'étude du génome procaryote est utilisée sur les souches de *Mycoplasma agalactiae* comme suit :

#### **III.5.1/ Digestion**

2 µg d'ADN Driver et 2 µg d'ADN Tester sont digérés par l'enzyme de restriction *Sau3A1* ou par l'enzyme *DraI* dans un volume final de 50 µl.

L'enzyme *Sau3A1* coupe en ↓GATC et laisse des bouts cohésifs. L'enzyme *DraI* coupe en TTT↓AAA et laisse des bouts francs.

Après une extraction au phénol / chloroforme / isoamyl alcool 25/24/1, les ADN sont précipités dans l'éthanol et resuspendus dans 15 µl d'eau. Leur concentration est estimée sur un gel d'agarose à 1 %.

#### **III.5.2/ Ligation**

Deux échantillons d'ADN Tester digéré (100 ng) sont séparément liés toute la nuit à 16°C avec les adaptateurs (20 pmol) dans un volume final de 10 µl par la T4 DNA ligase. Lorsque les ADN sont digérés par l'enzyme *Sau3A1*, les adaptateurs utilisés sont RJbam et RNbam (bouts cohésifs). Lorsque les ADN sont digérés par l'enzyme *DraI*, les adaptateurs utilisés sont RJblunt et RNblunt (bouts francs).

La ligase est ensuite inactivée par la chaleur 5 min à 72°C.

#### **III.5.3/ Soustraction 1**

10 ng de chaque échantillon d'ADN Tester lié à un adaptateur sont mélangés dans un volume final de 4 µl avec du tampon d'hybridation (HCl pH8,0 50 mM ; NaCl 0,5 M ; EDTA pH8,0 0,2 mM) et un excès d'ADN Driver digéré (600 ng), puis sont aussitôt dénaturés 1,5 min à 98°C et incubés 1 h 30 min à 55 ou 60°C.



### **III.5.4/ Soustraction 2**

Les deux résultats de la soustraction 1 (liés à RJ ou à RN) sont rapidement mis en commun, avec en plus 300 ng d'ADN Driver fraîchement dénaturé, dans du tampon d'hybridation et sont incubés pendant 18 h à 55 ou 60°C dans un volume final de 10 µl.

Le mix de soustraction est ensuite dilué dans 200 µl de tampon de dilution (HCl pH8,3 20 mM ; NaCl 50 mM ; EDTA pH8,0 0,2 mM).

Une PRC nichée est alors effectuée.

### **III.5.5/ PCR 1**

Pour la première PCR, l'amorce R24 est utilisée.

Les conditions de la réaction sont les suivantes : volume final de 25 µl avec 2,5 µl de tampon de réaction 10X, 200 µM de dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM d'amorce, 2,5 U de Taq polymérase et 1 µl d'ADN soustrait dilué comme matrice. Une hot start manuelle est effectuée.

Le programme comprend une étape de 2 min à 72°C, suivie de 25, 28 ou 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 52°C et 2 min à 72 ou 68°C, puis d'une étape d'extension finale de 10 min à 72°C ou 68°C.

### **III.5.6/ PCR 2**

Pour la deuxième PCR, les amorces J24 et N24 sont utilisées.

Les conditions de la réaction sont les suivantes : volume final de 25 µl avec 2,5 µl de tampon de réaction 10X, 200 µM de dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM d'amorce, 2,5 U de Taq polymérase et 1 µl du mix de la première PCR dilué au 1/40<sup>e</sup> dans de l'eau.

Le programme comprend une étape de 15 sec à 94°C, suivie de 25, 23 ou 18 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 49°C et 2 min à 72 ou 68°C, puis d'une étape d'extension finale de 10 min à 72°C ou 68°C.

## **III.6/ Transformation**

Environ 12 ng des produits de la PCR nichée sont insérés dans 12 ng de vecteur pGEM-T easy à l'aide de la T4 DNA ligase et sont laissés toute la nuit à 16°C.

Ces vecteurs sont ensuite transformés dans *Escherichia coli* DH5α, soit par électroporation, soit par la méthode du Chlorure de Rubidium (RbCl).

L'électroporation est réalisée dans des cuves de 2 mm, à 2.5 kV, 25  $\mu$ F et 200  $\Omega$ . Les cellules sont ensuite immédiatement transférées dans du milieu SOC (tryptone Bacto 2% ; extrait de levure Bacto 0,5 % ; NaCl 10 mM ; KCl 2,5 mM ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; MgSO<sub>4</sub> 10 mM ; glucose 20 mM).

Après électroporation ou choc thermique, les cellules sont agitées, en milieu nutritif sans antibiotique, 45 min à 37°C puis sont étalées sur gélose LB supplémentée avec de l'ampicilline 50  $\mu$ g/ml, du X-Gal 40  $\mu$ g/ml et de l'IPTG 40  $\mu$ g/ml.

### III.7/ Synthèse des sondes

Des colonies indépendantes sont piquées et conservées sur boîtes de Pétri. Les inserts portés par chaque clone sont amplifiés directement par PCR (31 cycles) à partir des cultures d'*E. coli*, en utilisant les amorces J24 et N24, la Digoxigenin-11-dUTP (Roche) et la Taq Platinum selon les recommandations du fabricant.

L'efficacité de la PCR est ensuite contrôlée sur gel d'agarose à 1 % : le nombre de bandes et la quantité de matériel amplifié sont évalués.

### III.8/ Les Southern blot

Pour les expériences de southern blot, 1  $\mu$ g d'ADN génomique est digéré par *Eco*RI, *Hind*III, *Dra*I, *Alw*I ou *Ase*I, et après électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 %, cet ADN est transféré sur une membrane en Nylon (Roche).

Le système de détection est utilisé selon les recommandations du fabricant.

Les sondes sont incubées 18 à 20 heures à 60°C avec les membranes dans du tampon de Church (SDS 7 % ; BSA V 1 % ; Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7,2 0,25 M). Puis les membranes sont rincées dans du 0,2X SSC ; 0,1% SDS et lavées dans cette solution pendant 1h à 60°C. La détection des sondes hybridées est réalisée avec l'anticorps anti-Dig Fab conjugué à la phosphatase alcaline et le réactif CDP-Star (Roche).

En ce qui concerne l'hybridation par la sonde A3F, le protocole est légèrement différent. L'incubation a lieu à 45°C, et les membranes sont lavées deux fois 10 min à 45°C dans du 6X SSC ; 0,1% SDS.

### III.9/ Analyse des séquences sur ordinateur

La conversion des séquences nucléiques en séquences protéiques, la comparaison et les alignements de ces séquences avec les séquences déjà enregistrées dans les banques de données sont réalisés grâce aux programmes BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> et aux programmes LFASTA et LALIGN sur le site web d'INFOBIOGEN <http://www.infobiogen.fr>

Manip	Soustraction <sup>a</sup>	ADN <sup>b</sup>	Enzyme <sup>c</sup>	HSS <sup>d</sup>	Cycles PCR <sup>e</sup>	Transformation <sup>f</sup>	Nbre de sondes testées <sup>g</sup>	Nom <sup>h</sup>
G'	PG2 - 7784	PG2 du 08/08/01	<i>Sau3A1</i>	60°C	30/23	DH5α - RbCl	12	SG'D5
F'	7784 - PG2	7784 du 29/11/02	<i>Sau3A1</i>	60°C	30/23	DH5α - RbCl	35	Ø
G'''	PG2 - 7784	PG2 du 08/08/01	<i>Sau3A1</i>	55°C	25/23	DH5α - RbCl	14	SG'''G7
F'''	7784 - PG2	7784 du 29/11/02	<i>Sau3A1</i>	55°C	25/23	DH5α - RbCl	22	Ø
L	PG2 - 7784	PG2 du 05/05/03	<i>Sau3A1</i>	55°C	25/23	DH5α - Electro	10	Ø
M	7784 - PG2	7784 du 05/05/03	<i>Sau3A1</i>	55°C	25/23	DH5α - Electro	8	Ø
P	PG2 - 7784	PG2 du 05/05/03	<i>DraI</i>	55°C	28/18	DH5α - Electro	10	SP3
Q	7784 - PG2	7784 du 05/05/03	<i>DraI</i>	55°C	28/18	DH5α - Electro	10	Ø
R	PG2 - 7784	PG2 du 05/05/03	<i>Sau3A1</i>	55°C	28/23 p	DH5α - RbCl	6	Ø
S	7784 - PG2	7784 du 05/05/03	<i>Sau3A1</i>	55°C	28/23 p	DH5α - RbCl	6	Ø
T	PG2 - 7784	PG2 du 05/05/03	<i>DraI</i>	55°C	28/23 p	DH5α - RbCl	6	ST2
U	7784 - PG2	7784 du 05/05/03	<i>DraI</i>	55°C	28/23 p	DH5α - RbCl	6	Ø

**Tableau 7** : Présentation des différentes conditions testées.

a/ ADN Tester – ADN Driver pour l'hybridation soustractive suppressive (HSS).

b/ Date de préparation du lot d'ADN.

c/ Enzyme de restriction par laquelle l'ADN a été digéré.

d/ Température de l'HSS.

e/ Nombre de cycles des deux PCR (PCR nichée) : PCR1/PCR2 ; p signifie qu'après la PCR2, les produits de PCR ont été purifiés avant le clonage dans pGEM-T.

f/ Conditions de la transformation. Utilisation de cellules d'*Escherichia coli* compétentes DH5α.

RbCl = Chlorure de Rubidium. Electro = Electroporation.

g/ Les sondes sont testées par southern blot sur bandelettes en Nylon portant les ADN des souches PG2 et 7784.

h/ Nom des sondes Tester-spécifiques isolées. Ø = aucune sonde Tester-spécifique isolée.

## IV/ RESULTATS - DISCUSSION

### IV.1/ Présentation des résultats

Plusieurs essais ont été réalisés pour effectuer les soustractions PG2-7784 et 7784-PG2. Le tableau 7 présente les conditions des différentes manipulations et le nom des sondes Tester-spécifiques isolées, lorsque c'est le cas.

Deux lots d'ADN sont utilisés : l'ADN de PG2 préparé le 08/08/01 avec l'ADN de 7784 préparé le 29/11/02, et les ADN de PG2 et de 7784 préparés le 05/05/03.

Plusieurs combinaisons de cycles de la PCR nichée (PCR1/PCR2) ont été testées. Des soustractions contrôle ont été réalisées : il s'agit des contrôles PG2-PG2 et 7784-7784. Après chaque PCR nichée, les amplifications ont été observées sur gel d'agarose à 1%. Les PCR pour lesquelles les amplifications des contrôles étaient les plus faibles et celles des soustractions PG2-7784 et 7784-PG2 étaient visualisables ont été retenues.

Une partie des produits de ces PCR ont été liés en masse dans le vecteur pGEM-T easy puis ces vecteurs ont été clonés dans *E. coli*.

Des colonies indépendantes de *E. coli* ont été ensuite piquées au hasard et les inserts portés par chaque clone ont été amplifiés par PCR avec marquage à la Dig-11-dUTP, afin de synthétiser des sondes. La spécificité de ces sondes à la souche Tester a été évaluée par southern blot sur des bandelettes en Nylon, chacune portant l'ADN des souches PG2 et 7784 digéré par l'enzyme *EcoRI*. Les bandelettes portent l'ADN des souches PG2 et 7784 des mêmes lots que ceux qui ont servis à l'hybridation soustractive suppressive. Après ce premier crible, les sondes spécifiques sont testées par southern blot sur deux membranes en Nylon : l'une porte l'ADN digéré par *HindIII* de 33 souches de *M. agalactiae* de provenance diverses, dont PG2 et 7784, et de la souche type de *M. bovis* PG45 (sous-collection A), et l'autre porte l'ADN digéré par *AseI* de 46 souches de *M. agalactiae* isolées dans les Pyrénées Atlantiques, dont la souche 7784, ainsi que la souche PG2 (sous-collection B). Les southern blot sur ces deux sous-collections de souches de *M. agalactiae* permet de noter la présence ou l'absence d'hybridation de ces sondes avec ces différentes souches et de confirmer leur spécificité à la souche Tester par rapport à la souche Driver.

Lors de cette étude, quatre sondes ont particulièrement attiré notre attention. Il s'agit des sondes D5, G7, P3 et T2, dont les caractéristiques seront détaillées dans les paragraphes suivants (figures 3 et 4 et tableaux 8 et 9).

Souche	Pays	Nombre de gènes <i>vpma</i> manquants	Sonde G7	Sonde D5	Sonde P3	Sonde T2
<b>PG2 type</b>	<b>Espagne</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
7327	Grèce	0	+	++	+	+
332	France PA	0	+	~	-	-
<b>7784</b>	<b>France PA</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>~</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
9600	Portugal	0	-	~	-	-
5210	France	0	+	~	-	-
9385	Portugal	0	+	~	-	-
5225	Espagne	0	+	~	-	-
9875	Espagne	0	+	~	-	-
7314	Grèce	0	+	++	+	+
5670	Espagne	0	+	~	-	-
5725	France PA	0	+	~	-	-
4021	France Av	0	+	~	-	-
6833	Italie	0	+	++	+	+
8750	France PA	0	+	~	-	-
5826	Espagne	0	+	~	-	-
6968	Espagne	0	+	~	-	-
009	Sardaigne	1	+	~	-	-
7169	Suisse	1	+	~	-	-
7375	Suisse	1	+	~	-	-
190 Vacc	Roumanie	1	-	+	+	+
4210	France	2	+	~	-	-
4258	France	2	+	~	-	-
8064	Côte d'Ivoire	3	+	-	+	+
4025	France Av	3	+	-	+	+
209	France	3	-	~	+	+
5632	Espagne	4	-	-	+	+
4054	France	4	-	-	+	+
4212	France	4	-	-	+	+
3990	France	5	+	-	+	+
4055	France	5	+	-	+	+
8063	Turquie	6	+	-	+	+
8062	Ethiopie	6	+	-	+	+
PG45 type	<i>M. bovis</i>	6	+	-	+	+

**Tableau 8** : Résultats des southern blot sur la sous-collection A de souches de *M. agalactiae*.

33 souches de *M. agalactiae* sont testées dont la souche type PG2. La souche de référence de *M. bovis* PG45 est aussi testée.

L'ADN de ces souches est digéré par *HindIII*.

PA = Pyrénées Atlantiques                      Av = Aveyron

Vacc = Souche vaccinale

~ = très faible hybridation

- = absence d'hybridation

+ = hybridation visible

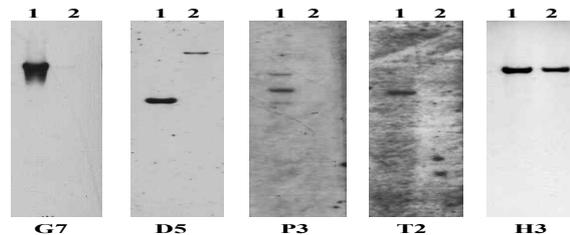
++ = présence d'une double bande

Ces souches sont classées dans ce tableau en fonction de la similarité de leurs gènes *vpma* par rapport à la souche PG2. [18]

Sonde testée	Résultat
G7	absent chez 5633, 5690, 7781, 7786, 8782 présent chez les autres souches
D5	présent chez PG2 faible réaction croisée chez toutes les autres souches
P3	présent chez PG2 uniquement
T2	présent chez PG2 uniquement

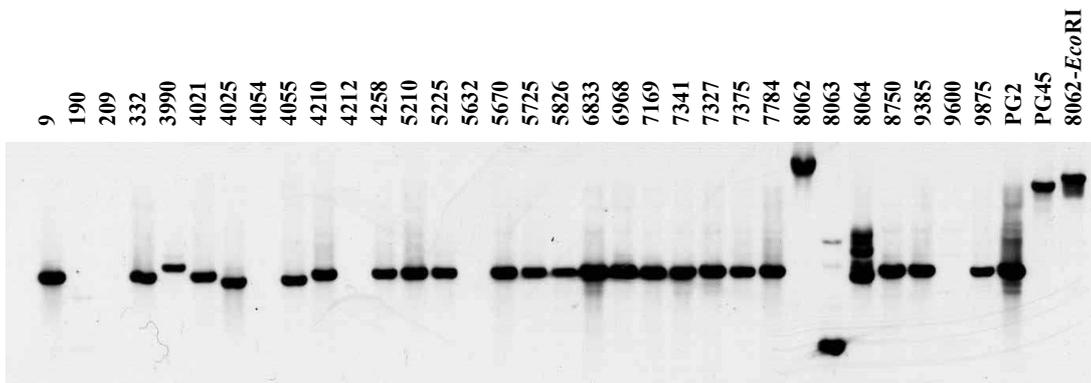
**Tableau 9** : Résultats des southern blot avec des souches de *M. agalactiae* isolées dans les Pyrénées Atlantiques (sous-collection B).

46 souches des Pyrénées Atlantiques dont la souche 7784 et la souche type PG2 sont testées. L'ADN de ces souches a été digéré par l'enzyme *AseI*.

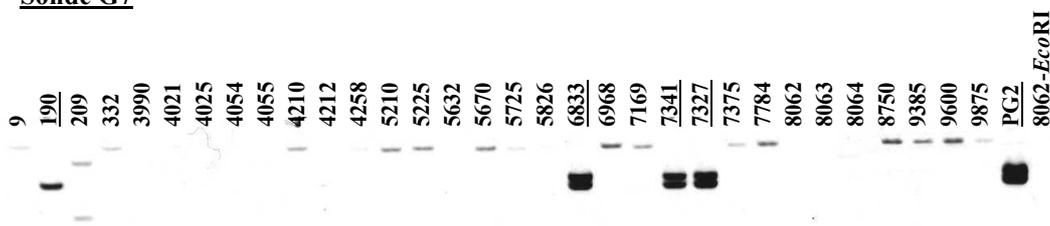


**Figure 3** : Evaluation de la spécificité des sondes à la souche Tester par southern blot sur bandelettes en Nylon.

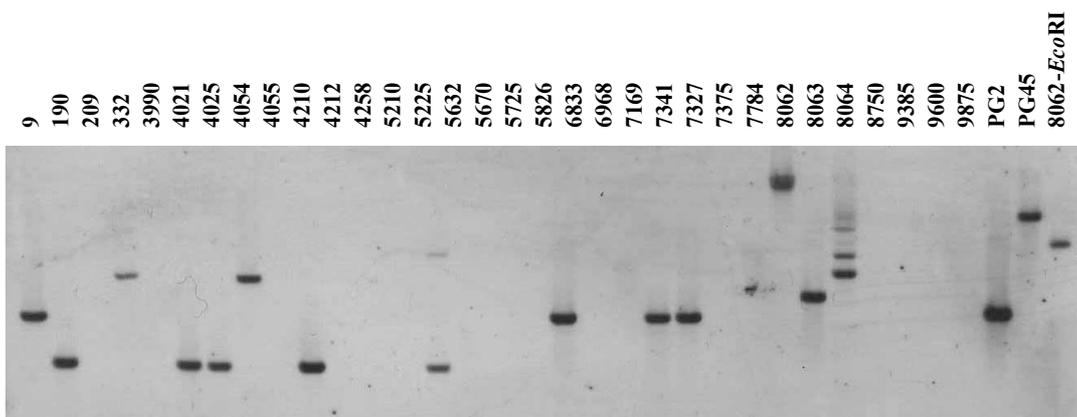
Chaque bandelette porte l'ADN des souches PG2 (colonne 1) et 7784 (colonne 2), digéré par *EcoRI*. Ici sont représentées quatre sondes Tester-spécifiques G7, D5, P3, T2 et une sonde non spécifique H3. Pour la sonde D5, une très légère hybridation avec la souche 7784 est constatée.



### Sonde G7



### Sonde D5



### Sonde P3 (T2)

**Figure 4** : Analyse par southern blot des sondes G7, D5, P3 et T2 sur les souches de la sous-collection A.

Les southern blot sont réalisés sur l'ADN de 33 souches de *M. agalactiae* dont les souches PG2 et 7784, et sur l'ADN de la souche type de *M. bovis* PG45 (souches de la sous-collection A). L'ADN de ces souches a été digéré par l'enzyme *Hind*III.

Il est à noter que l'ADN de la souche 8062 (colonne 26 à partir de la gauche) n'est pas sensible à la digestion par *Hind*III et a donc été aussi digérée par *Eco*RI (dernière colonne).

Nous retrouvons ici une légère hybridation de la sonde D5 avec l'ADN de la souche 7784.

Les profils obtenus avec la sonde T2 sont identiques à ceux obtenus avec la sonde P3, sauf pour la souche 8062 dont l'ADN est digéré par *Eco*RI : nous observons dans ce cas une bande de poids moléculaire plus faible qu'avec la sonde P3.

## IV.2/ Mise en évidence d'une instabilité génétique chez *M. agalactiae*

### 7784

• Lors du southern blot sur bandelette en Nylon la sonde G7 a reconnu l'ADN de la souche PG2 et ne s'est pas hybridé avec l'ADN de la souche 7784, ce qui signifie que cette sonde est spécifique de PG2 (figure 3). Cette sonde G7 est issue d'une banque provenant de la soustraction effectuée à 55°C de l'ADN de la souche 7784 du 29/11/02 à l'ADN de la souche PG2 du 08/08/01 (tableau 7).

Afin de savoir si la séquence G7 est présente dans le génome d'autres souches de *M. agalactiae*, et pour confirmer son absence dans la souche 7784, des southern blot sont réalisés sur les deux sous-collections de souches de *M. agalactiae* (figure 4 et tableaux 8 et 9).

Or la sonde G7 reconnaît l'ADN de la souche 7784 des deux sous-collections testées, ce qui n'est pas cohérent avec le résultat d'hybridation lors du premier crible. Il faut cependant noter que les préparations d'ADN de la souche 7784 appartenant aux sous-collections A et B ont été réalisées à deux dates différentes, antérieures à la préparation de la souche 7784 du 29/11/02 utilisée lors de l'hybridation soustractive suppressive.

Les southern blot sur les deux sous-collections de souches de *M. agalactiae* montrent aussi que le fragment G7 est absent du génome des souches 9600, 190, 209, 5632, 4054 et 4212 de la sous-collection A et des souches 5633, 5690, 7781, 7786 et 8782 de la sous-collection B. Par contre ce fragment est présent dans le génome de la souche type de *M. bovis*, PG45.

Après avoir constaté que la sonde G7 s'hybride avec l'ADN de la souche 7784 des deux sous-collections de souches de *M. agalactiae* mais pas avec l'ADN de la souche 7784 préparé le 29/11/02, nous avons formulé plusieurs hypothèses :

- soit l'ADN préparé le 29/11/02, qui a servi aux premières HSS de cette étude (manip F et G) n'appartient pas à la souche 7784 présente dans la collection et qui a servi à préparer l'ADN porté par les deux membranes A et B ; une telle situation pourrait s'expliquer par une erreur de manipulation ou d'étiquetage des tubes au sein de la collection,

- soit il y a eu contamination de la souche 7784 lors de sa remise en culture, probablement par une souche de *M. agalactiae* dont la croissance est plus rapide que celle de la souche 7784 et dont le génome ne possède pas le fragment portant G7 : la population de

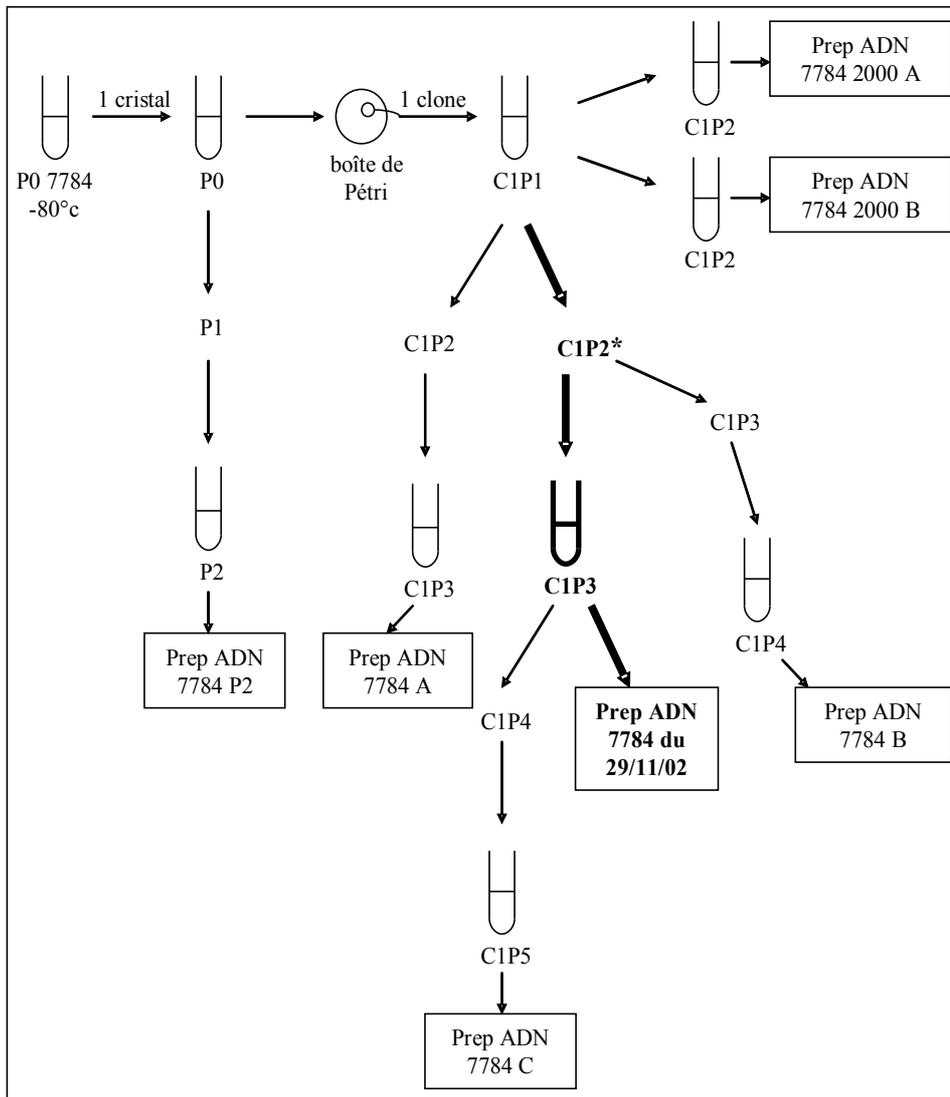


cette souche contaminante est devenue majoritaire et par conséquent la préparation d'ADN "7784" du 29/11/02 représente ce contaminant,

- soit la souche 7784 utilisée pour la soustraction a perdu un segment d'ADN après sa remise en culture, le fragment portant G7 appartiendrait alors à ce segment de génome instable. Il faut admettre dans cette hypothèse que cette instabilité ne s'est pas manifestée (ou uniquement à bas bruit) lors des préparations précédentes d'ADN de la souche 7784, pour des raisons indéterminées. Dans ce cas l'absence d'hybridation de la sonde G7 avec les 11 autres souches de *M. agalactiae* pourrait s'expliquer par un phénomène identique.

- Chaque souche appartenant à la sous-collection A possède un profil de gènes *vpma* qui lui est propre [18]. Sachant donc que la souche 7784 peut être différenciée de toutes les autres souches de la sous-collection A par son profil de gènes *vpma*, nous avons comparé le profil *vpma* de l'ADN de la souche 7784 préparé le 29/11/02 et utilisé lors des hybridations soustractives, à l'ADN de la culture P2 de la souche 7784, à celui de deux préparations d'ADN de la souche 7784 effectuées en 2000 (2000 A et 2000 B) en milieu Aluotto, à celui de trois préparations d'ADN correspondant aux différentes étapes de la préparation de l'ADN de la souche 7784 du 29/11/02 réalisées en milieu SP-4 Pyruvate (7784 A, B et C) (figure 5), et à celui de l'ADN de la souche type PG2.

Après digestion de ces préparations d'ADN par l'enzyme *AlwI* d'une part, et par l'enzyme *AseI* d'autre part, puis transfert sur membrane en Nylon, un southern blot est réalisé avec la sonde A3F. La comparaison des profils *vpma* par rapport au profil de référence de la souche PG2 a montré que toutes les préparations d'ADN de la souche 7784 possèdent le même profil, qui est identique à celui de la souche 7784 de la sous-collection A (figure 6). L'ADN utilisé le 29/11/02 appartient donc certainement à la souche 7784. Cependant, les souches de *M. agalactiae* provenant des Pyrénées atlantiques (sous-collection B) possèdent un profil similaire [18]. Il est donc théoriquement possible que nous ayons utilisé une autre souche des Pyrénées Atlantiques à la place de la souche 7784. Toutefois, comme les souches de cette sous-collection B n'ont pas été manipulées à l'époque de la préparation d'ADN du 29/11/02, cela est très peu probable.



**Figure 5** : Préparations de l'ADN 7784.

P0 = culture lyophilisée de la souche 7784 envoyée par l'AFSSA Lyon. Cette souche a été remise en culture dans du milieu Aluotto puis conservée à -80°C. Un cristal de P0 est prélevé, mis en culture puis étalé sur boîte de Pétri. Un clone est piqué au hasard puis est remis en culture, ce qui constitue la culture C1P1 (Clone 1, Passage 1).

C1PX = Clone 1, Passage X.

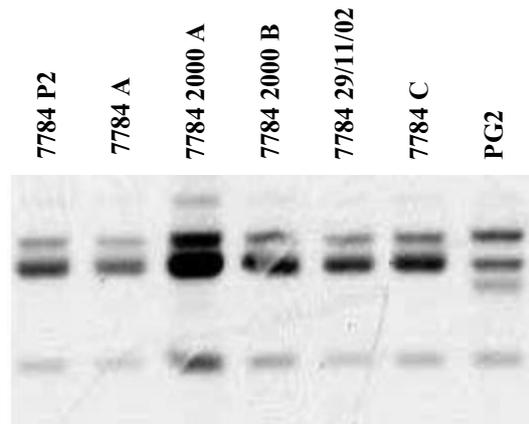
Prep ADN = Préparation de l'ADN.

**en gras** = mode de préparation de l'ADN 7784 du 29/11/02 qui a été utilisé lors de l'hybridation soustractive.

**C1P2\*** = \* indique l'étape lors de laquelle le fragment G7 a été perdu.

Les préparations des ADN 7784 2000 A et 2000 B sont d'anciennes préparations en milieu Aluotto effectuées en l'an 2000.

Les préparations des ADN 7784 P2, A, B et C ont été réalisées en vue de la comparaison des profils vpma.

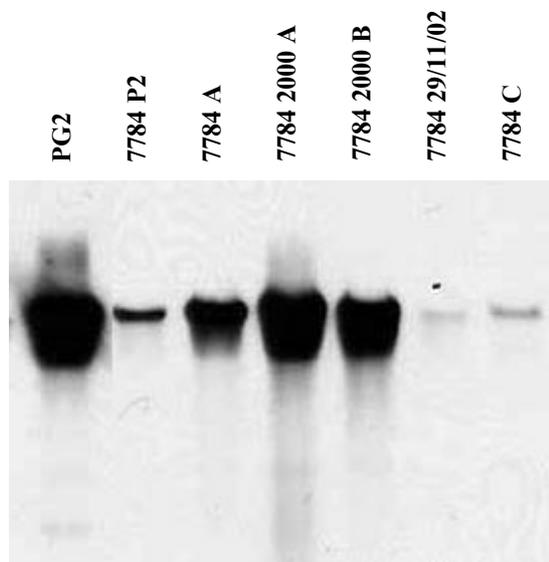


**Figure 6** : Comparaison des profils *vpma* de 7 préparations différentes d'ADN de la souche 7784 avec une préparation d'ADN de la souche PG2.

Les différentes préparations d'ADN de la souche 7784 sont présentées sur la figure 5. Les 8 préparations d'ADN ont été digérées par l'enzyme *AlwI* puis transférées sur membrane en Nylon. Un southern blot est réalisé avec la sonde A3F qui reconnaît une séquence commune aux gènes *vpma*.

Les préparations d'ADN de la souche 7784 possèdent un profil identique. Ce profil est différent de celui de la préparation d'ADN de la souche PG2 : une bande du profil de la souche PG2 est décalée vers le haut par rapport au profil des préparations de la souche 7784, et une bande supplémentaire est visible sur le profil de la souche PG2.

Le profil de la préparation 7784 B n'est pas représenté sur cette figure. Après une surexposition de la membrane, nous observons pour cette préparation le même profil que les autres préparations 7784.



**Figure 7** : Southern blot avec la sonde G7 sur 7 préparations d'ADN de la souche 7784 (présentées sur la figure 5) et sur une préparation d'ADN de la souche PG2.

L'ADN de ces souches a été digéré par l'enzyme *EcoRI*.

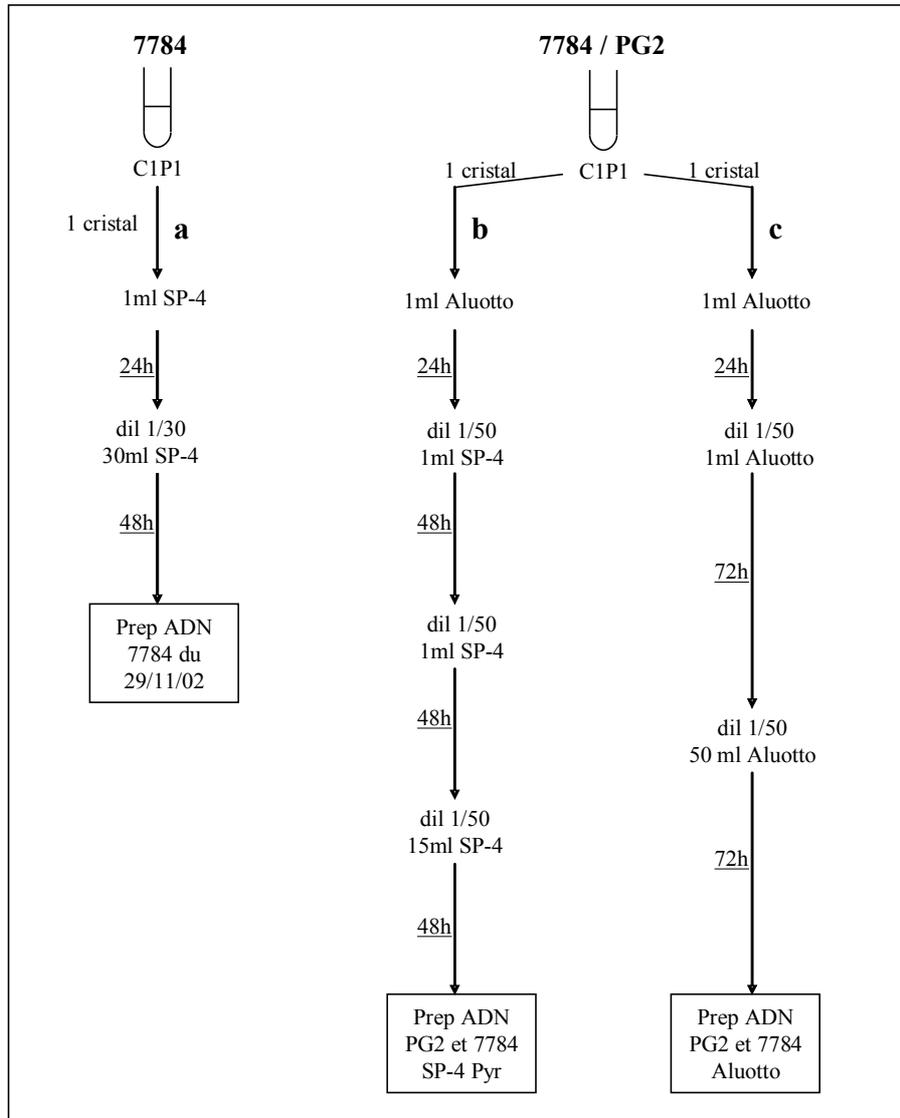
Le profil de la préparation 7784 B n'est pas représenté sur cette figure. La sonde G7 ne s'hybride pas avec les préparations d'ADN des souches 7784 B, 7784 C et 7784 du 29/11/02.

Ces préparations d'ADN ont également été digérées par l'enzyme *EcoRI* et un southern blot a été réalisé avec la sonde G7. Celui-ci nous a révélé que la sonde G7 reconnaît les préparations d'ADN PG2, 7784 P2, 7784 2000 A, 7784 2000 B et 7784 A mais ne reconnaît pas les préparations d'ADN 7784 B, 7784 C ainsi que la préparation d'ADN 7784 du 29/11/02 à partir de laquelle les hybridations soustractives suppressives ont été réalisées (figure 7).

L'ensemble de ces résultats indique que nous avons travaillé sur l'ADN de la souche 7784, mais que le génome de celle-ci a perdu le fragment portant G7 au cours des passages en culture, en ce qui concerne la préparation du 29/11/02. Ce fragment a très probablement été perdu dès la remise en culture de C1P1 en vue de l'hybridation soustractive suppressive (notée C1P2\* sur la figure 5).

- La sonde G7 donne un signal plus fort en southern blot avec les préparations d'ADN de la souche 7784 cultivée en milieu Aluotto (7784 2000 A et 7784 2000 B) qu'avec les préparations d'ADN de la souche 7784 cultivée en milieu SP-4 Pyruvate. Ceci pourrait s'expliquer en admettant que l'ADN de ces préparations (en milieu SP-4 Pyruvate) correspond en fait à deux sous-populations présentes dans le milieu de culture (une sous-population comportant le fragment portant G7 et l'autre ne le possédant pas), alors que l'ADN extrait d'une culture en milieu Aluotto proviendrait d'une population homogène (possédant le fragment portant G7). Le milieu SP-4 Pyruvate est un milieu riche permettant la croissance de *M. agalactiae* jusqu'à la phase de plateau (environ  $10^9$ – $10^{11}$  ufc/ml) en 24 à 36 h à 37°C. Le milieu Aluotto est un milieu moins riche, la phase de plateau est atteinte en 3 jours à 37°C. Nous avons donc émis l'hypothèse que la croissance de la souche 7784 dans un milieu "rapide" de type SP4 Pyruvate favorise l'apparition et/ou le développement d'une sous-population ne possédant pas le fragment portant G7. Au cours de passages successifs, cette sous-population serait amplifiée au détriment de l'autre, jusqu'à la rendre négligeable.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons essayé de reproduire la perte du fragment portant la séquence G7 par passages successifs en différents milieux de culture. Nous avons donc cultivé les souches 7784 et PG2 en milieu SP-4 Pyruvate et en milieu Aluotto selon le protocole schématisé dans la figure 8.



**Figure 8** : Schéma de repiquage des souches PG2 et 7784 en milieu SP-4 Pyruvate et en milieu Aluotto

a/ mode de préparation de l'ADN 7784 du 29/11/02, qui a été utilisé lors des hybridations soustractives suppressives

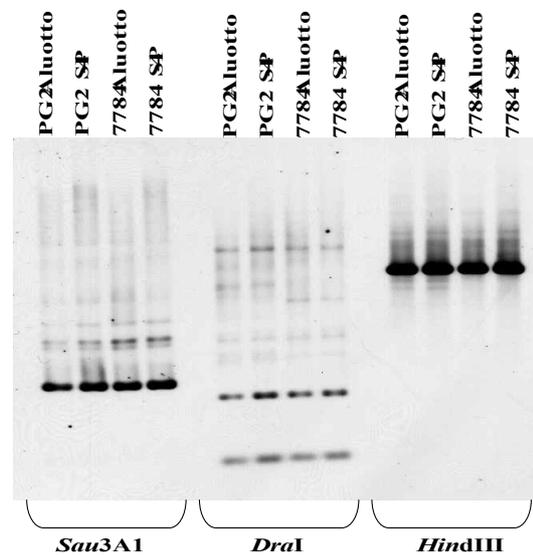
b/ repiquages en milieu SP-4 Pyruvate, pour essayer de reproduire la perte du fragment portant G7 dans le génome de 7784

c/ repiquages contrôles en milieu Aluotto : le fragment G7 doit être conservé si l'hypothèse est bonne

dil = dilution

prep ADN = préparation de l'ADN

Après digestion des ADN des souches PG2 et 7784 cultivées en milieu SP-4 et Aluotto par les enzymes de restriction *EcoRI*, *Sau3A1*, *DraI*, *HindIII* et *AlwI*, des southern blot ont été réalisés avec les sondes G7 (pour les digestions *EcoRI*, *Sau3A1*, *DraI* et *HindIII*) et A3F (pour la digestion *AlwI*). Lors de ces essais de passages en culture, nous n'avons pas reproduit la perte du fragment portant G7 ; le profil des gènes *vpma* est également inchangé (figure 9).



**Figure 9** : Analyse de préparations d'ADN des souches PG2 et 7784 par southern blot pour rechercher une éventuelle perte du fragment G7.

Les souches PG2 et 7784 ont été cultivées en milieu Aluotto et en milieu SP-4. L'ADN de ces souches a été digéré par les enzymes *Sau3A1*, *DraI* et *HindIII* puis des southern blot ont été réalisés avec la sonde G7.

Les souches PG2 et 7784 cultivées en milieu Aluotto et SP-4 ont toutes conservé le fragment G7.

Il est malgré tout possible que le milieu de culture influence la stabilité du fragment portant la séquence G7 ; des manipulations supplémentaires sont nécessaires pour identifier, s'ils existent, les facteurs déclenchant la perte du fragment portant G7 dans la souche 7784. Il faudrait continuer à effectuer des passages en série en milieu SP-4 Pyruvate et Aluotto afin de savoir si des passages supplémentaires entraînent la perte du fragment portant G7. Toutefois, il est possible que d'autres facteurs soient requis, comme par exemple les chocs thermiques ou les cycles congélation / décongélation des souches, pour que la délétion du fragment portant G7 se produise.

Aucune hypothèse ne peut être faite sur la ou les fonctions portées par ce fragment, mais il faut noter que si ce fragment est effectivement instable, celui-ci n'est pas indispensable *in vitro* à la croissance de *M. agalactiae*. *A contrario*, si nous trouvons le déterminisme de la perte du fragment portant G7, il sera intéressant de savoir si ce fragment est indispensable *in vivo* à la survie de *M. agalactiae*.

- La séquence G7 a été déterminée, elle comprend 800 pb.

L'analyse de la séquence G7 est réalisée par le programme Blastx, qui converti une séquence nucléotidique en séquences protéiques selon les 6 phases de lecture, les compare à des séquences protéiques déjà connues (enregistrées dans les banques de données) et propose des alignements locaux de séquences (tableau 10).

Protéines comparées	Organisme	N° séquence	Longueur comparée	Identité avec G7	Similarité avec G7	Phase de lecture de la séquence G7
protéine LppQ (445 aa)	<i>M. mycoides mycoides</i> SC	gb AAF27178.1	nt 4 à 795 de G7 avec les aa 38 à 301 de LppQ	47 %	62 %	+ 1
protéine H2 (323 aa)	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	gb AAF15239.2	nt 232 à 792 de G7 avec les aa 23 à 222 de H2	35 %	52 %	+ 1
protéine LppC (411 aa)	<i>M. mycoides mycoides</i> SC	gb AAK13041.1	nt 7 à 784 de G7 avec les aa 75 à 360 de LppC	32 %	49 %	+ 1

**Tableau 10** : Résultats de l'analyse de la séquence G7.

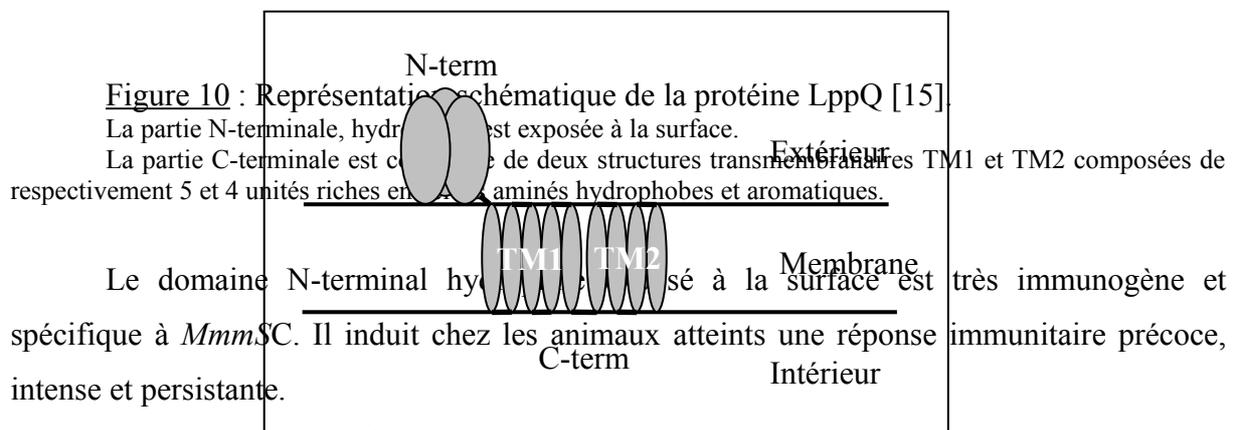
Ici sont présentées les homologues de séquences les plus importantes. La séquence G7 comporte aussi des homologues de séquence avec des protéines de surface ou des protéines hypothétiques appartenant à d'autres espèces de mycoplasmes : *M. mycoides* sp. *capri*, *M. sp. bovine* groupe 7, *MmmLC* et *M. capricolum capricolum*.

aa = acides aminés

nt = nucléotides

Le fragment G7 présente des similarités de séquence avec diverses lipoprotéines de mycoplasmes de ruminants. Les espèces de mycoplasmes en question appartiennent toutes au cluster *M. mycoides* : *MmmSC*, *M. capricolum capripneumoniae*, *M. mycoides* sp. *capri*, *M. sp. bovine* groupe 7, *MmmLC* et *M. capricolum capricolum*.

L'alignement de séquences présentant le plus d'identité et de similarité est l'alignement des nucléotides 4 à 795 de la séquence G7 avec les acides aminés 38 à 301 de la protéine LppQ qui est constituée de 445 acides aminés. Cet alignement comporte 47 % d'identité et 62 % de similarité. LppQ est une lipoprotéine de membrane découverte chez *Mycoplasma mycoides mycoides* Small Colony (*MmmSC*), agent de la péripneumonie contagieuse bovine (CBPP), maladie qui sera abordée plus en détail dans le sous-chapitre suivant. Le gène *LppQ* est présent chez toutes les souches de *MmmSC* y compris les souches vaccinales. La lipoprotéine LppQ est exposée à la surface de la bactérie et est associée à la membrane. Elle est constituée de deux domaines distincts : le domaine N-terminal, représenté par les 168 premiers acides aminés, hydrophile, est exposé à la surface ; le domaine C-terminal, représenté par les 250 derniers acides aminés, plus hydrophobe, est intégré à la membrane [1, 15] (figure 10).



Le domaine N-terminal hydrophile est exposé à la surface et est très immunogène et spécifique à *MmmSC*. Il induit chez les animaux atteints une réponse immunitaire précoce, intense et persistante.

Le domaine C-terminal, contenu dans la membrane, est composé d'unités répétées riches en acides aminés hydrophobes et aromatiques, qui pourraient être impliquées dans la formation de pores, dont la fonction n'est pas connue, dans la membrane de la bactérie.

Les caractéristiques du domaine N-terminal de LppQ ont fait de ce peptide un candidat pour le développement de tests sérologiques sensibles et spécifiques pour le contrôle de la CBPP [1, 15]. Un test ELISA indirect a été développé et semble être un outil prometteur pour la détection de la CBPP [9].

La protéine H2 est une protéine putative de membrane de *Mycoplasma capricolum capripneumoniae*, agent de la pleuropneumonie contagieuse caprine [23, 40].

LppC est une lipoprotéine découverte chez *MmmSC*, sur laquelle peu d'informations ont été publiées.



Il est cependant à noter qu'aucune instabilité génétique concernant les gènes de ces protéines (LppQ, H2 et LppC) n'a été décrite chez les espèces concernées, contrairement à ce qui a été observé pour le fragment portant G7.

Nous avons mis en évidence de façon fortuite la délétion d'un fragment du génome de la souche 7784 de *M. agalactiae*, le fragment portant G7. Le phénomène de délétion n'est pas nouveau chez les mycoplasmes. Par exemple, chez *M. bovis* une recombinaison intergénique dans le locus *vsp* génère une lipoprotéine de surface variable chimérique : il s'agit de la recombinaison entre le gène *vspA* et le gène *vspO* qui entraîne la formation d'un gène chimérique fonctionnel *vspC* et la délétion d'un fragment génomique [25]. Dans cet exemple, la délétion a une signification biologique qui est de générer de la diversité antigénique en modifiant la structure d'un gène, ce qui est peut être aussi le cas concernant la délétion du fragment portant G7.

Pour les hybridations soustractives suppressives qui ont suivi, nous avons abandonné la préparation d'ADN du 29/11/02, et nous avons utilisé les ADN du 05/05/03 préparés avec les cultures des souches PG2 et 7784 de *M. agalactiae* en milieu SP-4 Pyruvate. Ces préparations possèdent le fragment portant G7 et aucune donnée ne suggère que, lors de leur réalisation, une quelconque altération de la qualité de l'ADN ait pu se produire.

### IV.3/ Etude des sondes spécifiques à la souche PG2

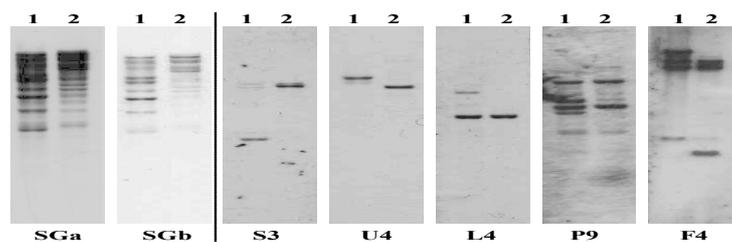
Nous avons recherché des sondes spécifiques à la souche de *M. agalactiae* de référence PG2 et des sondes spécifiques à la souche de terrain 7784.

La spécificité à la souche Tester de 145 sondes a été évaluée, dont 87 issues des soustractions 7784-PG2 et 58 issues des soustractions PG2-7784.

- Sur les 87 sondes issues des soustractions 7784-PG2 testées par southern blot sur bandelettes, aucune n'est spécifique de la souche 7784, quelles que soient les conditions des manipulations.

Cela laisse penser que les seules différences existantes entre ces deux souches sont des mutations ponctuelles non détectables. Il est également possible que le génome de la souche 7784 soit entièrement représenté dans celui de la souche PG2.

Les profils *vpma* des souches PG2 et 7784 sont légèrement différents. De plus, les southern blot sur bandelettes en Nylon mettent en évidence un polymorphisme de restriction entre ces deux souches, ce qui prouve que des différences existent tout de même entre les deux génomes PG2 et 7784 (figures 6 et 11).



**Figure 11 :** Profils de la sonde globale, du polymorphisme de restriction, des fragments chimères et des fragments répétés.

Chaque bandelette en Nylon porte l'ADN des souches PG2 (colonne 1) et 7784 (colonne 2), digéré par *EcoRI*.

La sonde SG est la sonde globale (SGa est 10 fois plus concentrée que SGb) synthétisée afin de savoir si la majorité des fragments amplifiés par PCR est spécifique au Tester, ce qui n'est pas le cas.

Les sondes S3 et U4 illustrent le polymorphisme de restriction entre les deux souches PG2 et 7784.

Les sondes L4 et P9 montrent un profil suggérant l'existence de fragments chimères.

Les sondes P9 et F4 suggèrent l'existence de fragments répétés.

- Sur les 58 sondes issues des soustractions PG2-7784, 6 sont spécifiques de la souche PG2 : il s'agit des sondes D5, P3 et T2 et de 3 autres sondes dont le profil en southern blot sur bandelettes est identique à celui obtenu avec la sonde D5. La sonde D5 s'hybride tout de même très légèrement avec l'ADN de la souche 7784 (tableau 7 et figure 3).

La sonde **D5** est issue d'une banque provenant de la soustraction, effectuée à 60°C, de l'ADN de la souche 7784 du 29/11/02 à l'ADN de la souche PG2 du 08/08/01, après digestion par *Sau3A1*. Les produits de la soustraction ont été amplifiés par une PCR nichée 30 cycles / 23 cycles, puis transformés par la technique du Chlorure de Rubidium (RbCl).

La sonde **P3** est issue d'une banque provenant de la soustraction, effectuée à 55°C, de l'ADN de la souche 7784 du 05/05/03 à l'ADN de la souche PG2 du 05/05/03, après digestion par *DraI*. Les produits de la soustraction ont été amplifiés par PCR 28/23 puis transformés par électroporation.

La sonde **T2** est issue d'une banque provenant de la soustraction, effectuée à 55°C, de l'ADN de la souche 7784 du 05/05/03 à l'ADN de la souche PG2 du 05/05/03, après digestion par *DraI*. Les produits de la soustraction ont été amplifiés par PCR 28/23 puis purifiés avant transformation par la technique du RbCl.

Chacune de ces trois sondes a été testée sur les deux sous-collections de souches de *M. agalactiae* et sur la souche PG45 de *M. bovis* (figure 4 et tableaux 8 et 9).

Les fragments **P3** et **T2** sont absents de toutes les souches des Pyrénées Atlantiques. Concernant les autres souches testées, les sondes **P3** et **T2** reconnaissent les mêmes souches : PG2, 7327, 7314, 6833, 190, 8064, 4025, 209, 5632, 4054, 4212, 3990, 4055, 8063, 8062 et la souche PG45 de *M. bovis*.

Toutefois, ces deux sondes présentent des différences : elles reconnaissent en southern blot des bandes de même poids moléculaire lorsque les préparations d'ADN des souches citées ci-dessus sont digérées par l'enzyme *HindIII*, mais des bandes de poids moléculaire différent lorsque la digestion est effectuée par l'enzyme *EcoRI* : c'est le cas de la souche PG2 (figure 3) et de la souche 8062 (résultat non montré).

La sonde **D5** reconnaît les souches PG2, 7327, 7314 et 6833 (présence de deux bandes) et la souche vaccinale 190 (présence d'une seule bande) (figure 4). Elle s'hybride très faiblement avec 19 souches de la sous-collection A, dont la souche 7784, et avec toutes les souches des Pyrénées Atlantiques : étant donnée la grande différence d'intensité de ces bandes avec celle des hybridations avec les souches PG2, 7327, 7314, 6833 et 190, nous

pouvons penser qu'il s'agit d'hybridations non spécifiques. Il est important de noter que les cinq souches reconnues par cette sonde sont aussi reconnues par les sondes **P3** et **T2**.

Ces résultats laissent supposer un lien entre ces trois sondes **D5**, **P3** et **T2**. Les 3 fragments portant ces séquences pourraient être situés dans des régions proches du génome, voire appartenir à un même opéron.

- **Bouleversement d'une classification des souches de *M. agalactiae* :**

Nous avons vu qu'une étude [18] basée sur les répertoires de gènes *vpma* des 33 souches de *M. agalactiae* de la sous-collection A a permis de proposer une classification de ces souches selon la similarité de leur répertoire de gènes *vpma* avec celui de la souche PG2. Cette classification est donc basée sur l'analyse d'un locus bien défini, et dont le système de variation est bien défini. Deux groupes de souches ont été proposés : celui des souches "proches" de la souche PG2 et celui des souches "éloignées" de la souche PG2. Parmi les souches testées, la souche 7327 est la plus "proche" et la souche 8062 est la plus "éloignée".

D'autres critères peuvent être utilisés pour classer ces différentes souches. Par exemple, l'anticorps monoclonal 1D4 peut reconnaître ou non les souches de *M. agalactiae*. Les souches reconnues par cet anticorps sont justement celles que nous avons appelées "proches" de la souche PG2 (voir I.8.1 de la 1<sup>ère</sup> partie et tableau 4 du chapitre "Matériels et Méthodes").

Une étude indépendante [27], basée sur des southern blot à partir de sondes issues de la soustraction de l'ADN de la souche PG45 de *M. bovis* à celui de la souche PG2 de *M. agalactiae* par la technique d'hybridation soustractive suppressive, vient confirmer ces observations. A l'inverse de l'étude des répertoires *vpma*, les sondes spécifiques à la souche PG2 obtenues ne sont pas nécessairement liées à un locus unique. Ainsi, 59 sondes spécifiques de la souche PG2 ont été testées sur 18 souches de *M. agalactiae*. Une classification de ces souches a alors été proposée en fonction de l'hybridation ou non de ces sondes avec l'ADN des différentes souches de *M. agalactiae* (résultats non montrés). Cette classification corrobore la classification basée sur les répertoires de gènes *vpma* : les souches pour lesquelles il manque au moins 3 gènes *vpma* ne sont pas reconnues par toutes les sondes spécifiques de la souche PG2 obtenues par la soustraction PG2-PG45.

D'après ces études, la souche 7784 apparaît "proche" de la souche PG2. Nous nous attendons donc à ce que les sondes issues de l'hybridation soustractive suppressive de l'ADN

de la souche 7784 à celui de la souche PG2 reconnaissent préférentiellement une partie des souches "proches" de la souche PG2.

Le résultat des southern blot avec la sonde **D5** est cohérent avec les classifications de ces deux études : les souches 7327, 7314, 6833 et 190 reconnues font partie du groupe auquel appartient la souche PG2. Au contraire, les souches plus "divergentes" par rapport à PG2 ne sont pas reconnues par cette sonde **D5**.

Les résultats des southern blot avec les sondes **P3** et **T2** sont à l'inverse plus surprenants. En effet, ces deux sondes reconnaissent les souches les plus "éloignées" de la souche PG2, et seules trois souches "proches" sont reconnues. Ces résultats bouleversent donc la classification proposée des souches de *M. agalactiae*.

- Analyse des séquences **D5**, **P3**, et **T2** :

La séquence **D5** comprend 203 pb. L'analyse de cette séquence n'a pas permis de trouver des homologies significatives avec des séquences connues.

La séquence **P3** comprend 345 pb.

L'analyse de la séquence **P3** est réalisée par le programme Blastx (tableau 11).

Protéines comparées	Organisme	N° séquence	Longueur comparée	Identité avec P3	Similarité avec P3	Phase de lecture de la séquence P3
Sous unité B du transporteur de glycérol (342 aa)	<i>M. mycoides mycoides</i> SC	gb AAG41805.1	nt 2 à 343 de P3 avec les aa 95 à 207 de la suB	69 %	89 %	+2
Sous unité B du transporteur de glycérol (342 aa)	<i>Mycoplasma</i> sp. "bovine groupe 7"	emb CAD12045.1	nt 2 à 343 de P3 avec les aa 95 à 207 de la suB	68 %	89 %	+2
Transporteur ABC (336 aa)	<i>M. pulmonis</i>	ref NP_326329.1	nt 2 à 343 de P3 avec les aa 101 à 209 du transporteur	37 %	63 %	+2
Transporteur ABC (319 aa)	<i>M. gallisepticum</i> R	ref NP_853029.1	nt 2 à 334 de P3 avec les aa 79 à 188 du transporteur	33 %	56 %	+2

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de la séquence P3.

aa = acides aminés

nt = nucléotides

suB = sous unité B

La séquence **T2** comprend 307 pb.

L'analyse de la séquence **T2** est réalisée par le programme Blastx (tableau 12).

Protéines comparées	Organisme	N° séquence	Longueur comparée	Identité avec T2	Similarité avec T2	Phase de lecture de la séquence T2
Sous unité B du transporteur de glycérol (342 aa)	<i>M. mycoides mycoides</i> SC	gb AAG41805.1	nt 98 à 307 de T2 avec les aa 20 à 89 de la suB	57 %	72 %	+2
Sous unité B du transporteur de glycérol (342 aa)	<i>Mycoplasma</i> sp. "bovine groupe 7"	emb CAD12045.1	nt 98 à 307 de T2 avec les aa 20 à 89 de la suB	55 %	71 %	+2
Sous unité A du transporteur de glycérol (406 aa)	<i>M. mycoides mycoides</i> SC	gb AAG41804.1	nt 4 à 93 de T2 avec les aa 376 à 405 de la suA	43 %	83 %	+1
Transporteur ABC (336 aa)	<i>M. pulmonis</i>	ref NP_326329.1	nt 71 à 307 de T2 avec les aa 13 à 95 du transporteur	29 %	50 %	+2
Transporteur ABC (319 aa)	<i>M. gallisepticum</i> R	ref NP_853029.1	nt 98 à 307 de T2 avec les aa 6 à 73 du transporteur	30 %	57 %	+2

**Tableau 12** : Résultats de l'analyse de la séquence T2.

aa = acides aminés

nt = nucléotides

suA = sous unité A

suB = sous unité B

• L'analyse des séquences **P3** et **T2** a révélé des homologies significatives avec des parties de séquences correspondant à des transporteurs ABC appartenant à d'autres espèces de mycoplasmes : *M. mycoides mycoides* SC, *M. sp.* "bovine groupe 7", *M. pulmonis* et *M. gallisepticum* R.

La famille des systèmes de transport ABC ("ATP-Binding Cassette") est constituée de protéines de transport membranaire très diverses qui couplent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP à la translocation de solutés à travers les membranes biologiques. Les membres de cette famille ne permettent pas uniquement l'entrée de nutriments mais sont impliqués dans des processus très variés comme la transduction de signaux, la sécrétion de protéines, la résistance à certains médicaments et antibiotiques, la présentation d'antigène, la pathogénicité des bactéries. Ces transporteurs ABC ont été identifiés chez les bactéries et les eucaryotes dont l'homme [37].

Un transporteur ABC typique est composé de deux protéines membranaires (perméases) chacune possédant six segments transmembranaires, de deux protéines fixant et hydrolysant l'ATP, et d'une protéine permettant de lier le substrat. La protéine liant l'ATP est le composant le plus conservé, les protéines transmembranaires sont moins conservées et la protéine liant le substrat est le composant le plus divergent, en termes de similarité de

séquences. Les gènes codant pour ces composants forment le plus souvent un opéron. Cependant, l'organisation structurale est variable, des fusions sont fréquentes entre ces différentes protéines [43].

Les domaines hydrolysant l'ATP sont caractérisés par deux motifs courts dont voici la structure primaire :

Site "A" : GXXGXGKS/T, X étant variable

Site "B" : hhhhD, h représentant un acide aminé hydrophobe.

Le site B est immédiatement précédé d'une séquence très conservée, unique à la famille des transporteurs ABC : LSGGQQ/R/KQR, appelée "séquence signature", et qui est devenue un outil très utile pour identifier de nouveaux membres de cette famille [37].

- Les séquences **P3** et **T2** présentent une forte homologie avec des fragments de séquence des sous unités du transporteur de glycérol de *M. mycoides mycoides* SC. Les nucléotides 2 à 343 de la séquence **P3** s'alignent avec les acides aminés 95 à 207 de la sous unité B du transporteur de glycérol de *MmmSC*. Les nucléotides 4 à 93 de la séquence **T2** s'alignent avec les acides aminés 376 à 405 de la sous unité A, et les nucléotides 98 à 307 de la séquence **T2** s'alignent avec les acides aminés 20 à 89 de la sous unité B du transporteur de glycérol de *MmmSC*.

*MmmSC* est comme nous l'avons vu précédemment l'agent étiologique de la péripneumonie contagieuse bovine (CBPP), qui atteint très sévèrement les troupeaux africains, avec un taux de mortalité variant de 30 à 80 %. La CBPP était endémique dans de nombreuses régions du monde pendant le 19<sup>e</sup> siècle. Cette maladie n'a jamais été éradiquée en Afrique, mais l'a été en Amérique du Nord, en Australie et en Europe au cours de la première moitié du 20<sup>e</sup> siècle [45].

La CBPP a réémergé dans le sud de l'Europe ces vingt dernières années. Cependant les observations épidémiologiques et cliniques indiquent que ces éruptions européennes sont moins virulentes que les cas rencontrés en Afrique. De plus, la CBPP en Europe apparaît sous une forme plus insidieuse, habituellement chronique, les animaux affectés montrent peu de signes cliniques et meurent rarement. Des infections expérimentales de bovins avec des souches africaines et européennes ont montré que la souche européenne récemment isolée, L2, est moins virulente que la souche africaine Afadé [45].

Malgré la forte pathogénicité de *MmmSC*, les facteurs de virulence restent inconnus. Une étude sur les souches L2 et Afadé de *MmmSC* a montré que la souche Afadé possède un opéron contenant les gènes *gtsA*, *gtsB* et *gtsC* codant pour des protéines de transporteur ABC,

GtsA, GtsB et GtsC (Gts pour Glycérol transport système), impliquées dans l'incorporation de glycérol. La souche L2 moins virulente ne possède pas les gènes *gtsB* et *gtsC* et n'est pas capable d'incorporer activement le glycérol. Le métabolisme du glycérol est accompagné de la libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, le système de transport de glycérol identifié dans la souche virulente africaine entraîne la libération d'une quantité importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un facteur de virulence potentiel qui endommage les cellules de l'hôte, absent chez les souches moins virulentes européennes [46].

L'analyse de l'opéron de la souche Afadé a montré qu'il est constitué de 3169 pb et que les trois ORF *gtsA*, *gtsB* et *gtsC* se chevauchent partiellement [46]. *gtsA* est compris entre les bases 87 et 1307 de l'opéron et la protéine GtsA est constituée de 406 acides aminés. *gtsB* est compris entre les bases 1285 et 2313 de l'opéron et la protéine GtsB est constituée de 342 acides aminés. *gtsC* est compris entre les bases 2291 et 3100 de l'opéron et la protéine GtsC est constituée de 269 acides aminés (figure 12, haut).

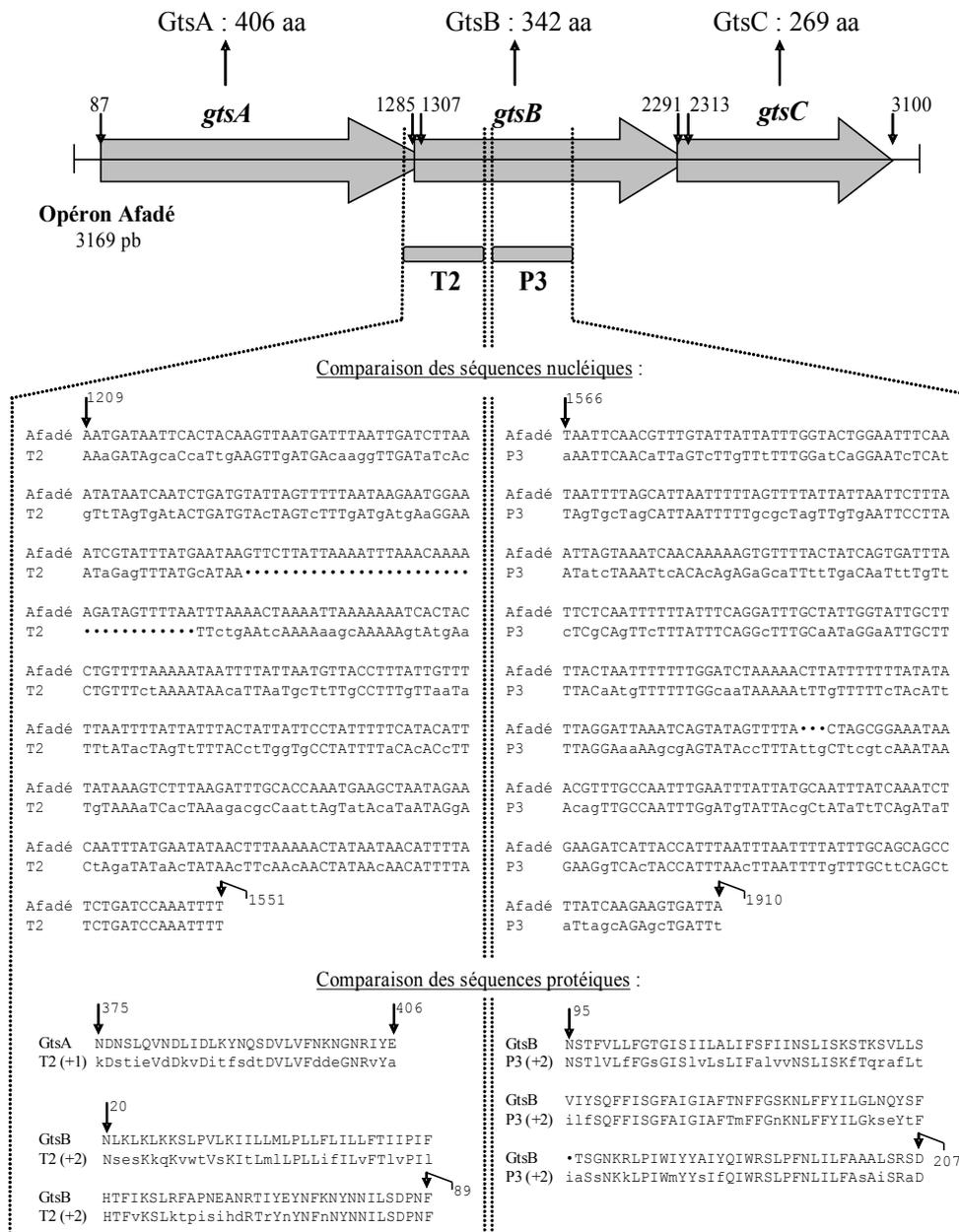
L'analyse de la protéine GtsA a révélé un motif de liaison à l'ATP (acides aminés 48 à 55) et une séquence signature des transporteurs ABC (acides aminés 213 à 227 : LSGGQKQRVAFKGI). Les analyses des protéines GtsB et GtsC n'ont pas mis de tels motifs en évidence mais ont prédit que chacune de ces protéines consiste en six domaines transmembranaires [46].

Nous avons comparé les séquences nucléotidiques de **P3** et **T2** aux séquences des gènes de l'opéron du transporteur de glycérol de la souche Afadé de *MmmSC*. Le programme LFASTA a révélé 69.97 % d'identité entre la séquence **P3** et les nucléotides 1566 et 1910 de l'opéron de la souche Afadé. Le programme LALIGN a révélé 62.60 % d'identité entre la séquence **T2** et les nucléotides 1209 et 1551, avec un gap entre les nucléotides 1307 et 1343.

Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 12.

D'après la comparaison des séquences nucléotidiques, la séquence **T2** est à cheval sur *gtsA* et *gtsB*. Comme les gènes *gtsA* et *gtsB* se chevauchent chez *MmmSC*, ce sont des phases de lecture différentes qui sont traduites pour synthétiser les protéines GtsA et GtsB. Dans la souche PG2 de *M. agalactiae*, c'est la phase +1 de **T2** qui correspond à la fin du gène *gtsA* putatif, et c'est la phase +2 de **T2** qui correspond au début du gène *gtsB* putatif. Le fait que les phases de lecture de **T2** soient décalées suggère une organisation similaire chez *M. agalactiae*, bien qu'un gap de 12 acides aminés soit présent (figure 12).





**Figure 12** : Comparaison des séquences nucléiques et protéiques des fragments P3 et T2 avec l'opéron de la souche Afadé de *Mycoplasma mycoides mycoides* SC.

L'opéron de la souche Afadé de *Mmm*SC contient 3 ORF, *gtsA*, *gtsB* et *gtsC*, se chevauchant partiellement et qui codent pour les protéines GtsA, GtsB et GtsC constituant un système d'incorporation du glycérol.

Les programmes Blast, LFASTA et LALIGN proposent des alignements des séquences nucléiques et protéiques des segments P3 et T2 avec l'opéron de la souche Afadé. Les lettres majuscules au niveau des séquences P3 et T2 représentent les identités avec les séquences de l'opéron de la souche Afadé.

Les • représentent les "gap".

Les fragments **P3** et **T2** montrent aussi de fortes homologies de séquence avec les gènes du transporteur ABC de glycérol de *Mycoplasma* sp. bovine groupe 7, responsable de polyarthrites, de mammites et de pneumonies dans les troupeaux bovins australiens [12].

*M. sp. bovine* groupe 7 est très proche de *MmmSC*, ce qui se retrouve dans les séquences des protéines GtsA, B et C avec respectivement 96.3 %, 96.2 % et 89.2 % d'identité avec les protéines GtsA, B et C de *MmmSC* [12].

Lors de l'étude de l'opéron de ce transporteur ABC chez *M. sp. bovine* groupe 7, il a été démontré que cette espèce de mycoplasme est capable d'incorporer le glycérol de façon active et produit du peroxyde d'hydrogène, tout comme *MmmSC*. Les amorces de PCR qui ont permis d'amplifier le locus du transporteur de glycérol de la souche Afadé et de la souche PG50 de *M. sp. bovine* groupe 7 n'ont pas amplifié de fragment chez *M. agalactiae* [12].

- Les résultats des southern blot suggéraient qu'un lien existe entre les séquences **P3** et **T2**. Cette observation est confortée par les résultats de l'analyse des séquences qui montrent que **P3** et **T2** pourraient se trouver sur un opéron codant pour un transporteur ABC.

Notre hypothèse est que la souche PG2 de *M. agalactiae* possède un opéron *gts* organisé de façon similaire à celui de la souche Afadé de *MmmSC*. Pour vérifier ceci il faudrait cloner et séquencer le locus contenant **P3** et **T2** chez PG2, s'il existe, et de rechercher les motifs liant l'ATP et la séquence signature afin de confirmer que nous sommes bien en présence d'un transporteur ABC chez *M. agalactiae*.

Une première manipulation simple avant cela serait de vérifier si les deux segments **P3** et **T2** sont contigus en effectuant une PCR et en utilisant comme amorces le début de la séquence **T2** et la fin de la séquence **P3**. Nous devrions ainsi amplifier un fragment dans la souche PG2 mais pas dans la souche 7784, et ce fragment devrait comporter entre 650 et 700 paires de bases.

Si la présence dans la souche PG2 de *M. agalactiae* d'un opéron correspondant à un transporteur ABC et contenant les fragments **P3** et **T2** est confirmée, rien ne nous permettrait d'affirmer qu'il s'agit d'un transporteur de glycérol. Pour le savoir, nous devrions alors mesurer l'incorporation de glycérol des souches de *M. agalactiae* possédant ou non les gènes du transporteur.

La souche Afadé de *MmmSC* et les souches de *M. sp. bovine* groupe 7 possèdent une activité hémolytique plus importante que les souches ne possédant pas le transporteur de glycérol [12, 45]. L'évaluation de l'activité hémolytique de ces souches a été effectuée sur gélose au sang supplémentée ou non de 1 mM de glycérol, les cultures ont été incubées en

milieu aérobie et anaérobie à 37°C pendant 72 h. Une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente l'effet hémolytique. Une façon simple de rechercher si nos souches de *M. agalactiae* possèdent un transporteur de glycérol serait donc d'effectuer des tests d'hémolyse, comme cela a été réalisé pour les souches de *MmmSC* et de *M. sp. bovine* groupe 7. Bien que l'activité hémolytique de *M. agalactiae* n'ait pas été décrite, nous pourrions faire un essai en testant les souches possédant ou non les fragments **P3** et **T2**. Nous pourrions alors soupçonner l'existence d'un transporteur de glycérol chez les souches présentant l'activité hémolytique et vérifier une corrélation avec la présence des fragments **P3** et **T2**.

Il est intéressant de noter que la souche PG2 de *M. agalactiae*, virulente, possède les fragments **P3** et **T2**, et donc un éventuel transporteur de glycérol qui pourrait expliquer une partie du pouvoir pathogène de cette souche, alors que la souche 7784 hypovirulente ne possède pas ces fragments. Les souches de *M. agalactiae* des Pyrénées Atlantiques, à part les souches 7783 et 7784, sont virulentes (elles ont été isolées à la suite d'épisodes cliniques d'agalactie contagieuse), et cependant aucune ne possède un seul de ces fragments **P3** et **T2**. Nous ne pouvons donc pas affirmer que la présence des fragments **P3** et **T2** soit nécessaire à la virulence.

Dans l'hypothèse où *M. agalactiae* possède un transporteur ABC dont l'opéron contient les séquences **P3** et **T2**, l'absence d'hybridation des sondes ne signifie toutefois pas l'absence de ce transporteur. Les souches de *M. agalactiae* non reconnues par les sondes **P3** et **T2** possèdent peut être des séquences différentes tout en préservant la fonction de ce transporteur. Ce transporteur pourrait par ailleurs jouer un rôle partiel dans la virulence, mais sans être indispensable pour qu'une souche soit virulente.

Par ailleurs, la souche 190, qui est une souche vaccinale vivante utilisée dans certains pays, est reconnue par les sondes **P3** et **T2** de la même façon que la souche PG2 virulente. La souche 190 présente probablement une virulence résiduelle, bien qu'elle soit peu pathogène en théorie. Si les fragments **P3** et **T2** appartiennent effectivement à un opéron impliqué dans la virulence, cet opéron est peut être tronqué dans la souche 190, ou bien la souche 190 a perdu d'autres facteurs de virulence nécessaires à une pleine expression du pouvoir pathogène, indépendamment ou en conjonction avec un possible système de transport du glycérol.

Parmi les souches "proches" de la souche PG2, les souches reconnues par les sondes **P3** et **T2** sont deux souches grecques (7314 et 7327), une souche italienne (6833) et la souche

vaccinale roumaine 190. Nous ne possédons pas d'autres souches de *M. agalactiae* isolées dans ces pays, mais nous pourrions essayer de nous en procurer afin de tester nos sondes **P3** et **T2** et de voir combien sont reconnues. Nous pourrions ainsi savoir si les fragments **P3** et **T2** ont un rapport avec la localisation géographique des souches.

Nous pouvons émettre des hypothèses pour tenter d'expliquer le fait que les fragments **P3** et **T2** soient absents chez certaines souches "proches" de PG2 :

- soit *M. agalactiae* possède un système homologue à celui de *MmmSC*, et certaines souches l'ont perdu par délétion, éventuellement au cours de passages en milieux de culture en laboratoire.

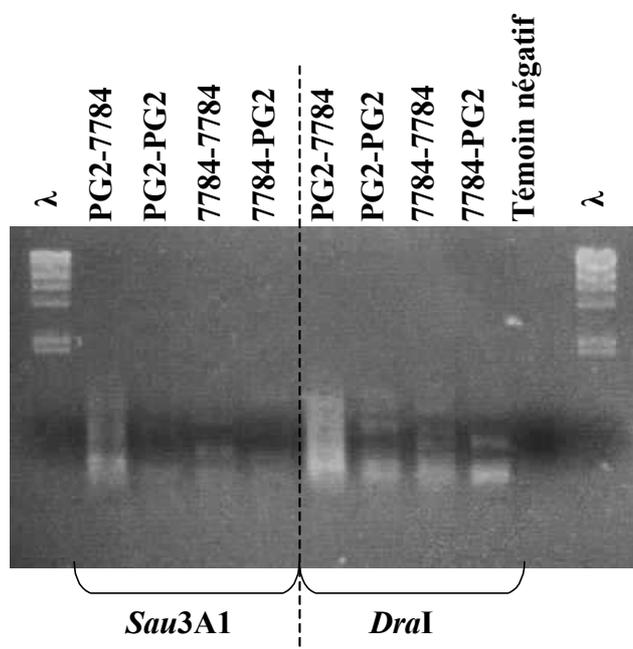
- soit deux groupes de souches virulentes de *M. agalactiae* se sont développés au cours de l'évolution : l'un possédant le système d'incorporation de glycérol (ou autre) et l'autre ne le possédant pas.

- soit il y a eu échange de matériel génétique par transfert latéral de gènes lors de coinfection : - entre une souche de *MmmSC* et une souche de *M. agalactiae*. Etant donné le pourcentage d'identité des séquences nucléotidiques **P3** et **T2** avec celle de l'opéron Afadé, le transfert latéral serait alors très ancien.

- ou entre deux souches de *M. agalactiae*, la "donneuse" appartenant au groupe "éloigné" de la souche PG2.

#### IV.4/ Problèmes liés au bruit de fond

Le bruit de fond correspond à l'amplification, par la PCR nichée qui suit l'hybridation soustractive suppressive, de fragments présents dans le Tester et le Driver qui n'ont pas été éliminés par le Driver. Afin de l'évaluer, nous avons réalisé des contrôles négatifs : il s'agit des soustractions contrôle PG2-PG2 et 7784-7784 pour lesquelles, en théorie, nous ne devrions pas observer d'amplification. L'éventuel bruit de fond peut être visualisé, après une PCR nichée, sur gel d'agarose à 1 %. Des amplifications ont été observées pour ces deux contrôles négatifs (figure 13).



**Figure 13** : Illustration du bruit de fond (amplification des contrôles négatifs).

L'ADN des souches PG2 et 7784 a été digéré par les enzymes *Sau3A1* et *DraI*. Les soustractions PG2-PG2 et 7784-7784 sont les soustractions contrôles pour lesquelles nous ne souhaitons pas observer d'amplification. Le témoin négatif est un contrôle sans ADN.  $\lambda$  = marqueur de poids moléculaire : lambda digéré par l'enzyme de restriction *HindIII*.

Dans cet exemple, les soustractions ont été effectuées à 55°C et les PCR 1 et 2 de la PCR nichée comportent respectivement 28 et 23 cycles.

Nous observons des amplifications nettes surtout pour les ADN digérés par *DraI*. Cependant ces amplifications concernent aussi les soustractions contrôles, ce que nous voulions éviter. Nous observons aussi l'amplification du contrôle négatif 7784-7784 lorsque les ADN sont digérés par *Sau3A1*.

Nous avons cherché à obtenir la plus faible amplification possible de ces contrôles par rapport à l'amplification des soustractions PG2-7784 ou 7784-PG2. C'est pourquoi plusieurs conditions ont été testées. Les deux souches comparées dans cette étude, PG2 et 7784, sont plus "proches" que les souches précédemment comparées par cette technique, les souches PG2 et 5632 [26]. Il est probable que la proximité des profils *vpma* se reflète sur l'ensemble du génome ; dans ce cas la séquence des génomes des deux souches PG2 et 7784, dans leur ensemble, se ressemblent fortement. Cette proximité génomique peut être à l'origine de nos problèmes. Nous avons donc essayé d'affiner la mise au point de l'hybridation soustractive suppressive entre deux souches "proches".

Les modifications ont concerné principalement le nombre de cycles de la PCR nichée, mais aussi la température de la soustraction (tableau 13).

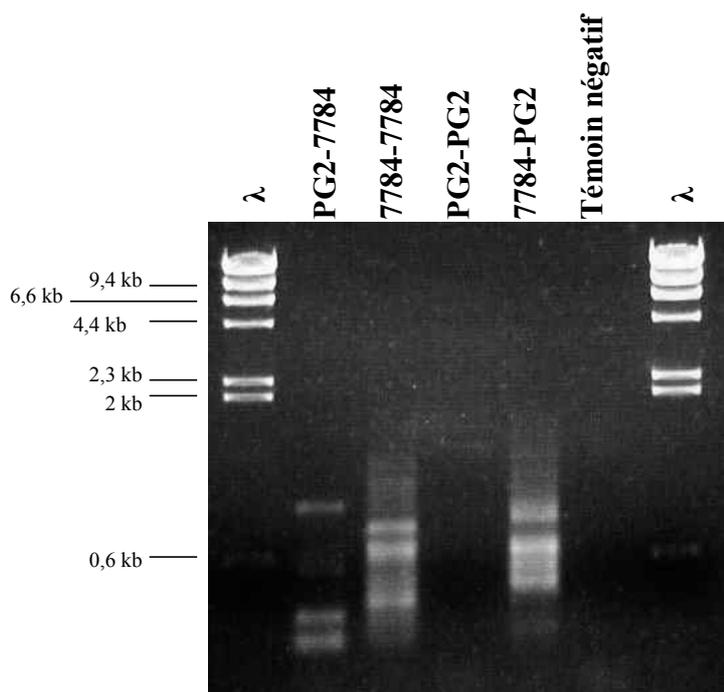
Température de la soustraction	Nombre de cycles de la PCR nichée (PCR1/PCR2)
55°C	30/23 ; <b>28/23</b> ; <b>25/23</b> ; 23/23 ; <b>28/18</b> ; 25/18.
60°C	<b>30/23.</b>

**Tableau 13** : Les différentes conditions testées lors de la comparaison des souches PG2 et 7784 par la technique d'hybridation soustractive suppressive.

Deux températures de soustraction ont été testées : 55°C et 60°C. Différentes combinaisons de cycles de PCR ont été testées (PCR1/PCR2) : **en gras** figurent les combinaisons retenues pour la suite de l'étude, les autres ayant entraîné une amplification des contrôles jugée trop importante.

Avec certaines combinaisons de cycles de la PCR nichée le bruit de fond était trop élevé. Nous avons à plusieurs reprises réussi à rendre acceptable, voire éliminer, le bruit de fond du contrôle PG2-PG2. Les plus grandes difficultés ont concerné le contrôle 7784-7784 : l'amplification non désirée était souvent très importante. Cependant le profil du contrôle 7784-7784 est souvent différent de celui de la soustraction 7784-PG2, en particulier lors de la HSS à 60°C (figure 14). Nous avons alors considéré que les amplificats du contrôle 7784-7784 n'étaient pas nécessairement présents dans l'essai 7784-PG2, et que ces produits de PCR pouvaient donc être utilisés pour constituer nos banques de fragments.

Les principales origines du bruit de fond sont le nombre de cycles des PCR et la température de la soustraction. Cependant il est difficile de trouver les conditions idéales.



**Figure 14** : Essai pour diminuer l'amplification des soustractions contrôles.

L'ADN des souches PG2 et 7784 a été digéré par l'enzyme *Sau3A1*. Les soustractions ont été effectuées à 60°C et les PCR 1 et 2 de la PCR nichée comportent respectivement 30 et 23 cycles. Les soustractions PG2-PG2 et 7784-7784 sont les soustractions contrôles pour lesquelles nous ne souhaitons pas observer d'amplification. Le témoin négatif est un contrôle sans ADN.  $\lambda$  = marqueur de poids moléculaire : lambda digéré par l'enzyme de restriction *HindIII*.

Nous n'observons pas d'amplification concernant le contrôle PG2-PG2, ce qui nous laisse penser que les 3 fragments amplifiés après la soustraction PG2-7784 sont spécifiques à PG2.

Nous observons une amplification importante de la soustraction contrôle 7784-7784, mais le profil de ce contrôle est différent du profil de l'amplification du contrôle 7784-PG2.

- La température :

Si nous augmentons la température de la soustraction, l'hybridation en hétéroduplex Tester et Driver, même légèrement divergents, sera plus rare. Nous favorisons ainsi le clonage de ces fragments à condition qu'ils puissent s'hybrider en homoduplex.

Si nous diminuons la température de la soustraction, deux fragments légèrement différents pourront s'hybrider en hétéroduplex et seront éliminés, et seuls resteraient des fragments intégralement présents uniquement dans le Tester, ou présentant des différences importantes avec le Driver. Mais si la température est trop diminuée, chaque brin d'ADN spécifique du Tester va trouver trop facilement son brin complémentaire, et ce d'autant plus que l'étape de soustraction dure 1h30.

Nous devons ainsi trouver un compromis entre perdre des informations (en diminuant la température et en éliminant des fragments légèrement différents) et augmenter la proportion de fragments non spécifiques (en augmentant la température).

Nous pouvons penser qu'il serait intéressant d'augmenter la température d'hybridation, éventuellement jusqu'à 65°C.

- Les PCR :

Une augmentation du nombre de cycles de PCR entraîne l'amplification linéaire de séquences non spécifiques. Une diminution trop importante du nombre de cycles de PCR peut entraîner la perte d'informations.

Un mésappariement des amorces peut provoquer la formation de fragments non issus de l'amplification exponentielle mais tout de même clonables.

De même, un excès d'amorces, un excès de matrice, une mauvaise température d'hybridation des amorces peuvent donner une amplification non désirée.

Enfin, le bruit de fond important du contrôle négatif 7784-7784 pourrait aussi être dû à une instabilité génétique dans cette souche. La technique d'HSS est indiquée si le Tester est homogène, par contre la présence de sous-populations diminue l'efficacité de cette technique.



#### IV.5/ Faible proportion de fragments Tester-spécifiques dans la banque

- Sur 145 sondes testées, seulement 7 sont spécifiques au Tester. La sonde G7 est spécifique de la souche PG2 par rapport à l'ADN de la souche 7784 préparé le 29/11/02, les sondes D5, P3 et T2 sont spécifiques de PG2. De plus en southern blot, 3 sondes reconnaissent un profil similaire à celui de la sonde D5. Ces 3 sondes ont été obtenues de la même façon que la sonde D5. Nous avons donc supposé que nous pouvions être en présence de 4 exemplaires de la même sonde.

Le rendement de l'hybridation soustractive suppressive dans cette étude, c'est-à-dire le nombre de sondes spécifiques/nombre total de sondes testées, est donc de 4.83 %, ce qui est très faible par rapport au résultat espéré compte tenu d'essais antérieurs réalisés avec d'autres souches. Nous nous attendions en effet à un rendement supérieur à 50 %.

Un grand nombre de produits de soustraction non spécifiques est donc amplifié, cloné et représenté dans la banque, éventuellement en plusieurs exemplaires. Ce faible rendement est ainsi lié à l'importance du bruit de fond.

Mais il est aussi possible que nos deux souches PG2 et 7784 soient trop proches pour que nous réussissions à mettre en évidence plusieurs fragments spécifiques à l'une d'elles avec nos conditions (température d'hybridation soustractive et nombre de cycles de PCR) par cette méthode d'hybridation soustractive suppressive. Il est possible que l'essentiel des différences entre les souches PG2 et 7784 réside dans des éléments non accessibles par HSS, ce qui est le cas par exemple des mutations ponctuelles.

- Ce qui nous surprend, c'est le fait que nous observons sur gel d'agarose à 1 % une différence d'amplification entre la soustraction et le contrôle, nette surtout pour la soustraction PG2-7784 et son contrôle PG2-PG2 (et moins nette pour la soustraction 7784-PG2 et son contrôle), mais pourtant nous n'arrivons pas à isoler "suffisamment" de fragments spécifiques. Nous pouvons donc penser que des problèmes apparaissent lors de l'étape de ligation au plasmide ou lors de l'étape de clonage dans *Escherichia coli*.

Nous avons alors émis l'hypothèse que des résidus du mix de PCR créent peut être des interactions qui gênent l'étape de clonage, ce qui participerait à la perte d'information. C'est pourquoi nous avons décidé de purifier les produits de PCR avant l'étape de clonage. Cette purification n'améliore pas le rendement : une seule sonde spécifique (T2) a été isolée à la suite de cette purification, sur 36 sondes testées (rendement de 2,78 %). La présence d'éventuels résidus de réactifs de PCR n'explique donc pas ce faible rendement.

Cela nous a donc conduit à fabriquer une sonde qui représente l'ensemble des produits de la PCR2, avant les étapes de ligation et de clonage qui conduisent à la préparation des sondes spécifiques. Il s'agit d'un mélange de sondes qui devrait nous indiquer si l'immense majorité des fragments amplifiés est spécifique au Tester. Les fragments non spécifiques présents dans la sonde doivent être "noyés dans la masse".

Cette sonde (appelée "sonde globale") est construite à partir de la soustraction PG2-7784 (préparations d'ADN du 05/05/03) : une première PCR de 28 cycles est effectuée, puis une deuxième PCR de 23 cycles avec marquage à la Dig-11-dUTP est réalisée. Nous avons ainsi obtenu une sonde dont tous les fragments sont marqués à la Dig-11-dUTP. Nous avons testé directement cette sonde par southern blot sur bandelettes en Nylon portant les ADN des souches PG2 et 7784. Cependant, les profils obtenus par cette sonde ne montrent pas de réelle différence entre les souches PG2 et 7784 (figure 11).

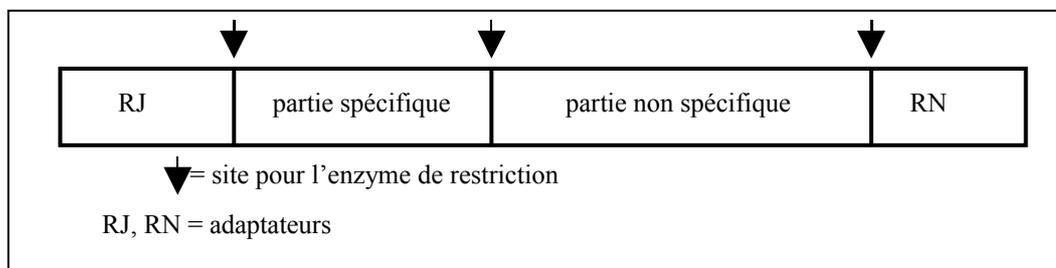
Cela signifie que cette sonde globale possède très peu de fragments spécifiques à la souche PG2. Les fragments amplifiés par PCR ne sont pas spécifiques, ce n'est donc pas au niveau des étapes de ligation au plasmide et de clonage que nous perdons des informations, mais en amont.

Nous pouvons penser que les fragments spécifiques sont "noyés" dans les fragments non spécifiques.

Sur la figure 14, nous pouvons constater que 3 fragments sont amplifiés par PCR nichée 30 cycles puis 23 cycles à la suite de la soustraction PG2-7784 effectuée à 60°C alors que nous n'observons pas d'amplification pour le contrôle PG2-PG2. Ces 3 fragments pourraient donc être spécifiques à la souche PG2. Cependant, un seul fragment spécifique a été isolé dans ces conditions, le fragment D5. Nous pourrions faire migrer les produits de la PCR sur gel d'acrylamide puis le découper pour récupérer ces trois fragments pour les analyser : il faudrait pour cela les insérer dans un vecteur et les cloner dans *E. coli*, puis piquer des clones et synthétiser des sondes pour tester leur spécificité et éventuellement déterminer la séquence de l'insert.

- Nous ne sommes pas capables d'expliquer les différences observées entre l'amplification de la soustraction et celle du contrôle, ces amplifications étant reproductibles. De plus le système a été validé, les soustractions entre les souches PG2 et 5632 [26] et entre les souches PG2 et PG45 [27] donnant des résultats satisfaisants.

- Une autre façon d'expliquer certains résultats est de supposer que des fragments chimères se sont formés. Ces fragments seraient composés d'une partie spécifique et d'une partie non spécifique au moins, et se formeraient lors de la ligation (figure 15). Cela est possible si les deux fragments se rencontrent avant de fixer un adaptateur à leurs deux extrémités.



**Figure 15** : Un exemple de fragment chimère schématisé.

Lors de l'étape de ligation, un fragment spécifique va se lier à un fragment non spécifique au lieu de fixer un adaptateur à chacune de ses deux extrémités.

Puis lors de la soustraction, la fraction non spécifique est reconnue et le fragment chimère est éliminé dans la majorité des cas, ce qui participe à la perte d'information.

Certains de ces fragments chimères, s'ils ne sont pas éliminés par le Driver lors de la soustraction, pourraient également être présents dans le bruit de fond.

Parmi les profils obtenus, lors des southern blot, par certaines sondes reconnaissant les deux souches PG2 et 7784, le nombre de bandes observées n'est pas toujours le même pour ces deux souches. Cela suggère l'existence de tels fragments chimères. En effet, lors du southern blot, chaque fraction de fragment chimérique va s'hybrider avec le segment d'ADN correspondant fixé sur la membrane en Nylon. La fraction spécifique au Tester va s'hybrider avec sa contrepartie de l'ADN Tester, mais ne va pas s'hybrider avec l'ADN Driver. Une bande absente dans l'un des deux profils pourrait donc correspondre à un fragment spécifique (figure 11).

Afin de vérifier l'hypothèse de l'existence de fragments chimères, il faudrait effectuer une digestion des plasmides dont l'insert donne un profil suspect lors du southern blot. Cela

permettrait d'individualiser chaque fragment. Après une nouvelle ligation et un clonage de ces produits, nous pourrions peut être isoler des fragments spécifiques.

Nous pourrions essayer de mettre une quantité plus importante d'adaptateurs lors de l'étape de ligation pour diminuer la probabilité pour deux fragments d'ADN de se lier, et éviter ainsi la formation de fragments chimères.

#### IV.6/ Présence éventuelle de séquences répétées

Les southern blot sur bandelettes ont souvent mis en évidence la présence de plusieurs bandes (figure 11). Ceci peut être expliqué de plusieurs façons.

Un site *EcoRI* peut être présent au sein d'un fragment isolé lors d'une hybridation soustractive (les ADN ont alors été digérés soit par *Sau3A1*, soit par *DraI*). Comme les ADN portés par les bandelettes sont digérés par *EcoRI*, les sondes possédant un site *EcoRI* peuvent reconnaître plusieurs fragments. Cela explique la présence de deux bandes, mais pas la présence de trois bandes et plus. En effet il faudrait pour cela qu'un fragment présente plusieurs sites *EcoRI* entre deux sites *Sau3A1* ou *DraI*. Or cela est peu probable puisque *Sau3A1* coupe en GATC alors qu'*EcoRI* coupe en GAATTC, séquence moins fréquente que la première. Nous aurions pu vérifier cela en digérant les sondes par *EcoRI* et en comptant le nombre de bandes obtenues sur gel d'agarose.

Ce nombre de bandes parfois élevé peut aussi être expliqué par la présence de séquences répétées, phénomène très fréquent chez les mycoplasmes. Le chromosome des mycoplasmes peut en effet porter des éléments répétés variés. Cela suggère un grand potentiel de recombinaison dans le génome mycoplasmaïque [34]. Ces éléments répétés peuvent être des séquences d'insertion, des transposons, des segments d'ADN viral ou plasmidique. Ainsi une séquence d'insertion, *ISMag1*, a déjà été décrite chez *M. agalactiae* [29]. Par ailleurs, des fragments répétés sont présents dans certains gènes comme les *vsp* de *M. bovis* ou les *vpma* de *M. agalactiae*.



## CONCLUSION

Lors d'études antérieures, l'hybridation soustractive suppressive (HSS) s'est révélée être une technique efficace pour rechercher des différences entre les génomes de deux souches de mycoplasmes appartenant à deux espèces différentes, *M. agalactiae* PG2 et *M. bovis* PG45 [27], ou à la même espèce, *M. agalactiae* PG2 et 5632 [26]. Cependant, lors de ces travaux, cette technique a dû être mise au point par rapport au protocole décrit pour les bactéries classiques. En particulier la température d'hybridation, initialement de 63°C, a été abaissée à 55°C étant donné la faible teneur en bases G + C des mycoplasmes.

Or, au cours de ce travail de thèse, nous avons été confrontés à une importante amplification non spécifique, ce qui est très certainement dû à la grande proximité génomique entre les deux souches de *M. agalactiae* étudiées, PG2 et 7784 (la plupart des séquences de ces deux souches étant probablement faiblement divergentes). Cette proximité explique en partie le fait que seules sept sondes Tester-spécifiques aient été isolées. Il est donc important de continuer à rechercher les meilleures conditions possibles afin de mettre au point la HSS lors de la comparaison de souches très proches de *M. agalactiae*.

Lorsque la méthode sera affinée, l'étape suivante consistera à comparer deux souches de *M. agalactiae* isolées dans les Pyrénées Atlantiques. Ces souches, qui proviennent donc d'une même zone géographique, apparaissent toutes très homogènes. Elles sont de plus presque toutes virulentes. Cependant quatre souches ont été isolées dans les Pyrénées Atlantiques en 1994-1995 à partir de troupeaux ne présentant pas de signes clinique de l'agalactie contagieuse, dont la souche 7784. Donc, si nous réussissons à comparer la souche 7784 avec une souche virulente des Pyrénées Atlantiques, il est très probable que les différences observées aient un lien avec le pouvoir pathogène.

Par ailleurs, un projet de séquençage de la souche de référence de *M. agalactiae*, PG2, est en cours. Lorsque ce séquençage sera terminé, l'analyse du génome pourra nous apporter des informations intéressantes, notamment en ce qui concerne l'hypothétique opéron de transporteur ABC comportant les séquences P3 et T2.

En outre, l'utilisation de la HSS a remis en cause une classification proposée des souches de *M. agalactiae*, qui les sépare en souches "proches" ou "éloignées" de la souche PG2. Ceci nous indique donc qu'il faut rester prudent lors de l'interprétation d'études épidémiologiques. De nombreux outils permettant d'évaluer la proximité entre plusieurs

souches se développent, dont le système de typage MLST (MultiLocus Sequence Typing) qui compare les séquences d'un nombre limité de gènes de ménage [13] : cette méthode pourra être adaptée chez *M. agalactiae* lorsque la souche PG2 sera séquencée.

Cependant, l'utilisation de la HSS pour rechercher des facteurs de virulence a des limites. En effet, une souche peut porter un gène impliqué dans la virulence mais ne pas l'exprimer. C'est par exemple le cas du gène codant pour l'adhésine P40, non exprimé par certaines souches de *M. agalactiae* [14]. En nous limitant à rechercher la présence ou l'absence d'un fragment du génome, nous nous exposons ainsi à ignorer des facteurs de virulence.

Afin d'y remédier, une autre façon de comparer deux souches consiste à comparer leurs transcriptomes, toujours au moyen de la HSS pour laquelle certains kits de comparaison des transcrits sont commercialisés. Pour cela, il faut au préalable obtenir de l'ADN complémentaire après avoir isolé l'ARN total, puis les soumettre à la même méthode d'analyse.

Ce type d'approche devra être mise en place dans un avenir proche pour compléter l'étude du pouvoir pathogène des mycoplasmes.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
Mlle BONNEFIN Nathalie  
a été admis(e) sur concours en : 1998  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juillet 2003  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Marc MAREDA, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
autorise la soutenance de la thèse de :

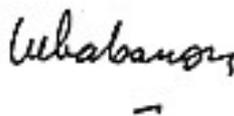
Mlle BONNEFIN Nathalie  
intitulée :

*"Comparaison de la souche 7784 hypovirulente de Mycoplasma agalactiae à la souche type virulente PG2 par  
la technique d'hybridation soustractive suppressive"*

Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Marc MAREDA



Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Gérard CHABANON



Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Pierre DESNOYERS



Vu le : 18 NOV 2003  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Jean-François SAUTEREAU







## BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Abdo E.M., Nicolet J., Frey J.** : Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2000** ; 7 (4) : 588-595.
- [2] **Akopyants N.S., Fradkov A., Diatchenko L., Hill J.E., Siebert P.D., Lukyanov S.A., Sverdlov E.D., Berg D.E.** : PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998** ; 95 : 13108-13113.
- [3] **Aluotto B.B., Wittler R.G., Williams C.O., Faber J.E.** : Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int. J. System. Bacteriol.*, **1970** ; 20 : 35-58.
- [4] **Bergonier D.** : Etude de la variabilité intraspécifique de *Mycoplasma agalactiae*. Bases pour l'amélioration du diagnostic de l'Agalactie Contagieuse. *Thèse d'Université, Université Claude Bernard, Lyon, France*, **1996**.
- [5] **Bergonier D., De Simone F., Russo P., Solsona M., Lambert M., Poumarat F.** : Variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1996** ; 143 : 159-165.
- [6] **Bergonier D., Poumarat F., Pepin M., Leuret P., Berthelot X.** : Agalactie contagieuse des petits ruminants : clinique et épidémiologie. *Point Vet.*, **1996** ; 28 (180) : 779-788.
- [7] **Bergonier D., Berthelot X., Poumarat F., Van de Wiele A., Valognes A., Leuret P., Lambert M., Pepin M.** : Etat actuel et perspectives du contrôle de l'agalactie contagieuse des petits ruminants. *Point Vet.*, **1997** ; 28 (186) : 1727-1736.
- [8] **Bergonier D., Van De Wiele A., Marena M., Berthelot X.** : L'agalactie contagieuse chez les ovins. *Point Vet., Numéro spécial 33 : Pathologie ovine et caprine*, **2002** : 52-57.
- [9] **Bruderer U., Regalla J., Abdo E.M., Huebschle O.J.B., Frey J.** : Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.*, **2002** ; 84 : 195-205.
- [10] **Dandekar T., Snel B., Schmidt S., Lathe W., Suyama M., Huynen M., Bork P.** : Comparative genome analysis of the mollicutes. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, edited by Razin and Herrmann, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002** ; Chapter 11 : 255-278.
- [11] **Diatchenko L., Lau Y.F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D.** : Suppression subtractive hybridization : a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996** ; 93 : 6025-6030.

- [12] Djordjevic S.P., Vilei E.M., Frey J. : Characterization of a chromosomal region of *Mycoplasma* sp. bovine group 7 strain PG50 encoding a glycerol transport locus (*gtsABC*). *Microbiology*, **2003** ; 149 : 195-204.
- [13] Enright M.C., Spratt B.G. : Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.*, **1999** ; 7 (12) : 482-487.
- [14] Fleury B. : Caractérisation de protéines membranaires impliquées dans l'adhésion et l'induction immunogénique chez *Mycoplasma agalactiae*. *Thèse d'Université, Université Paul Sabatier, Toulouse III, France, 2001*.
- [15] Frey J., Abdo E.M., Nicolet J. : Genetic and antigenic characterization of LppQ, a specific lipoprotein of *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. In *COST Action 826, Mycoplasmas of ruminants : pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J., Johansson K.E., **2001** ; 10-13.
- [16] Galisson C. : Evaluation clinique du pouvoir pathogène d'une souche réputée avirulente de *M. agalactiae*. *Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 2001*.
- [17] Glew M.D., Papazisi L., Poumarat F., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C. : Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infect. Immun.*, **2000** ; 68 (8) : 4539-4548.
- [18] Glew M.D., Marena M., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C. : The *vpma* gene repertoires of *Mycoplasma agalactiae*. In *COST Action 826, Mycoplasmas of ruminants : pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J., Johansson K.E., **2001** ; 18-21.
- [19] Glew M.D., Marena M., Rosengarten R., Citti C. : Surface diversity in *Mycoplasma agalactiae* is driven by site-specific DNA inversions within the *vpma* multigene locus. *J. Bacteriol.*, **2002** ; 184 (21) : 5987-5998.
- [20] Himmelreich R., Plagens H., Hilbert H., Reiner B., Herrmann R. : Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res.*, **1997** ; 25 (4) : 701-712.
- [21] Johansson K.E., Pettersson B. : Taxonomy of *Mollicutes*. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, edited by Razin and Herrmann, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002** ; Chapter 1 : 1-29.
- [22] Krieg, Holt, : Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1. Edited by Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. **1984**.
- [23] Lorenzon S., Wesonga H., Ygesu L., Tekleghiorgis T., Maikano Y., Angaya M., Hendriks P., Thiaucourt F. : Genetic evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains and molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia by sequencing of locus H2. *Vet. Microbiol.*, **2002** ; 85 : 111-123.

- [24] Lysnyansky I., Sachse K., Rosenbusch R., Levisohn S., Yogev D. : The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis* : gene organization and structural features. *J. Bacteriol.*, **1999** ; 181 (18) : 5734-41.
- [25] Lysnyansky I., Ron Y., Sachse K., Yogev D. : Intrachromosomal recombination within the *vsp* locus of *Mycoplasma bovis* generates a chimeric variable surface lipoprotein antigen. *Infect. Immun.*, **2001** ; 69 (6) : 3703-3712.
- [26] Marena M.S., Vilei E.M., Poumarat F., Frey J., Berthelot X. : Validation of the suppressive subtractive hybridization method in *Mycoplasma agalactiae* species by the comparison of a field strain with the type strain PG2. **2003**, *Soumis*.
- [27] Marena M.S., Poumarat P., Berthelot X. : Comparison of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* type strains by suppression subtractive hybridization and identification of sequences specific of *Mycoplasma agalactiae* species. *En préparation*
- [28] Office International des Epizooties (OIE) : Site de l'OIE (page consultée le 07 juillet 2003) : Classification OIE des maladies [en ligne].  
Adresse URL : [http://www.oie.int/fr/maladies/fr\\_classification.htm](http://www.oie.int/fr/maladies/fr_classification.htm)
- [29] Pilo P., Fleury B., Marena M., Frey J., Vilei E.M. : Prevalence and distribution of the insertion element ISMag1 in *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Microbiol.*, **2003** ; 92 : 37-48.
- [30] Poumarat F., Perrin B., Longchambon D. : Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, **1991** ; 29 : 329-338.
- [31] Poumarat F., Le Grand D., Bergonier D. : Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point Vet.*, **1996** ; 28 (180) : 761-769.
- [32] Razin S. : Molecular properties of *Mollicutes* : a synopsis. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 1, edited by Rayin and Tully, Academic Press, New York, **1995** : 1-25.
- [33] Razin S., Yogev D., Naot Y. : Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **1998** ; 62 (4) : 1094-1156.
- [34] Rocha E.P.C., Blanchard A. : Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Res.*, **2002** ; 30 (9) : 2031-2042.
- [35] Rosengarten R., Citti C., Glew M., Lischewski A., Droesse M., Much P., Winner F., Brank M., Sperser J. : Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis : virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *Int. J. Med. Microbiol.*, **2000** ; 290 : 15-25.
- [36] Sanchis R., Abadie G., Lambert M., Cabasse E., Dufour P., Guibert J.M., Pepin M. : Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae* : comparative pathogenicity of six field strains. *Vet. Res.*, **2000** ; 31 : 329-337.
- [37] Schneider E., Hunke S. : ATP-binding-cassette (ABC) transport systems : Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domain. *FEMS Microbiol. Rev.*, **1998** ; 22 : 1-20.

- [38] **Sitaraman R., Dybvig K.** : Restriction-modification systems and chromosomal rearrangements in mycoplasmas. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, edited by Razin and Herrmann, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002** ; Chapter 16 : 371-390.
- [39] **Teachman A.M., French C.T., Yu H., Simmons W.L., Dybvig K.** : Gene transfer in *Mycoplasma pulmonis*. *J. Bacteriol.*, **2002** ; 184 (4) : 947-951.
- [40] **Thiaucourt F., Lorenzon S., David A., Breard A.** : Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.*, **2000** ; 72 : 251-268.
- [41] **Tola S., Idini G., Rocchigiani A.M., Manunta D., Angioi P.P., Rocca S., Cocco M., Leori G.** : Comparison of restriction pattern polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by pulsed field gel electrophoresis. *J. Vet. Med. B.*, **1999** ; 46 : 199-206.
- [42] **Tola S., Manunta D., Rocca S., Rocchigiani A.M., Idini G., Angioi P.P., Leori G.** : Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine*, **1999** ; 17 : 2764-2768.
- [43] **Tomii K., Kanehisa M.** : A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res.*, **1998** ; 8 : 1048-1059.
- [44] **Tully J.G.** : Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology* : Molecular Characterization, edited by Razin and Tully, Academic Press, San Diego, **1995** : 33-39.
- [45] **Vilei E.M., Abdo E.M., Nicolet J., Botelho A., Gonçalves R., Frey J.** : Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology*, **2000** ; 146 : 477-486.
- [46] **Vilei E.M., Frey J.** : Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC : its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2001** ; 8 (1) : 85-92.
- [47] **Winstanley C.** : Spot the difference : applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J. Med. Microbiol.*, **2002** ; 51 : 459-467.
- [48] **Yogev D., Browning G.F., Wise K.S.** : Genetic mechanisms of surface variation. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, edited by Razin and Herrmann, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002** ; Chapter 19 : 417-443.

Toulouse, 2003

NOM : BONNEFIN  
NATHALIE

PRENOM :

TITRE :

Comparaison de la souche 7784 hypovirulente de *Mycoplasma agalactiae* à la souche type virulente PG2 par la technique d'hybridation soustractive suppressive.

RESUME :

*Mycoplasma agalactiae* est l'agent principal responsable de l'agalactie contagieuse des ovins et caprins, un syndrome largement répandu dans le monde et regroupant des atteintes mammaires, articulaires et oculaires.

Afin de rechercher les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *M. agalactiae*, la technique d'hybridation soustractive suppressive, qui permet l'identification de séquences présentes dans un génome mais absentes d'un autre, a été utilisée. Deux souches de *M. agalactiae* ont été comparées : la souche type PG2, virulente, et la souche 7784, hypovirulente.

Deux fragments d'ADN spécifiques du génome de PG2 ont été isolés ; ils pourraient appartenir à un opéron codant pour un transporteur de glycérol impliqué dans la virulence. Par ailleurs, cette étude a mis en évidence une instabilité génétique dans la souche 7784. Il apparaît toutefois nécessaire d'optimiser cette technique pour pouvoir comparer des souches de *M. agalactiae* dont les génomes sont peu divergents.

MOTS-CLES :

*Mycoplasma agalactiae* / agalactie contagieuse / pouvoir pathogène / hybridation soustractive

---

ENGLISH TITLE :

Comparison of the *M. agalactiae* hypovirulent strain 7784 to the type strain PG2 by the suppression subtractive hybridization method.

ABSTRACT :

*Mycoplasma agalactiae* is the major causal agent of contagious agalactia, a widespread syndrome in ovine and caprine species, usually characterized by mastitis in lactating animals, arthritis, and conjunctivitis. In order to identify the molecular basis of *M. agalactiae* virulence, suppression subtractive hybridization, a method that allows identification of sequences that are present in one genome but not in the other, was used. Two strains were compared : the virulent type strain PG2 and the hypovirulent strain 7784.

Two PG2-specific DNA fragments were isolated, that could belong to a glycerol uptake transporter operon possibly involved in virulence. A genetic instability was observed in the strain 7784. It is however necessary to improve this technique in order to compare closely related *M. agalactiae* strains.

KEY WORDS :

*Mycoplasma agalactiae* / contagious agalactia / pathogenicity / subtractive hybridization