

A notre président de thèse,

**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 notre jury de thèse,

**Monsieur le Docteur Marc MARENDA**

**Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie de la Reproduction**

En témoignage de notre reconnaissance pour son accueil toujours chaleureux, son intérêt pour ce travail et ses bons conseils.

**Monsieur le Docteur Gilles MEYER**

**Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie des ruminants**

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.  
Qu'il trouve ici la marque de toute notre considération.

Je tenais aussi à remercier Evelyne Sagné et Christine Citti pour leurs précieux conseils et leur disponibilité. Un grand merci pour tout.

Il va sans dire que les gens que j'aime sont remerciés et que je n'ai pas attendu mes 27 ans et la rédaction de ma thèse pour le leur dire.



# SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION GENERALE :</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>1/ <i>M.agalactiae</i> et <i>M.bovis</i> : deux mycoplasmes de ruminants :</b> -----  | <b>17</b> |
| 1.1- Taxonomie et phylogénie : .....   | 17        |
| 1.2- Le pouvoir pathogène de <i>M.agalactiae</i> et de <i>M.bovis</i> : .....  | 21        |
| 1.2.1- Les mycoplasmoses dues à <i>M.agalactiae</i> et <i>M.bovis</i> : .....  | 23        |
| 1.2.1.1- Importance de ces deux mycoplasmoses : .....  | 23        |
| 1.2.1.2- Epidémiologie : .....   | 23        |
| 1.2.1.3- Tableau clinique : .....  | 24        |
| 1.2.1.4- Diagnostic : .....  | 25        |
| 1.2.1.5- Traitements et prophylaxie : .....  | 25        |
| 1.2.2- Les bases moléculaires du pouvoir pathogène de <i>M. agalactiae</i> et de <i>M. bovis</i> :<br>de la découverte de facteurs de virulence au transfert de gènes de pathogénicité : ..... | 26        |
| <b>2/ Transfert de gènes et éléments extrachromosomiques chez les mycoplasmes:-----</b>  | <b>28</b> |
| 2.1- Transformation : .....  | 29        |
| 2.2- Transduction : .....  | 30        |
| 2.3- Conjugaison : .....   | 32        |
| 2.4- Transposition : .....   | 33        |
| <b>3/ Les éléments conjugatifs intégratifs (ICE) :-----</b>  | <b>35</b> |
| 3.1-Définition : .....   | 35        |
| 3.2-Nomenclature : .....   | 35        |
| 3.3- Diversité des ICE : .....   | 37        |
| 3.4- Mode de fonctionnement des ICE : .....  | 40        |
| 3.4.1- Etapes générales du transfert : .....   | 40        |
| 3.4.2- Caractéristiques des intégrases impliquées dans l'excision et l'intégration des<br>ICE : .....  | 46        |
| 3.4.3- La spécificité des sites d'insertion : .....  | 46        |
| 3.4.4- Différences et points communs entre les ICE et les autres éléments génétiques<br>mobiles : .....  | 47        |
| 3.4.5- Régulation du transfert de gènes : rôle des antibiotiques : .....   | 48        |
| 3.5- Particularités des ICE : .....  | 49        |
| 3.5.1- Un élément original : SXT de <i>V.cholerae</i> : .....  | 49        |
| 3.5.2- Les éléments NBU de <i>Bacteroides</i> : des ICE handicapés ? : .....   | 51        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.3- Les îlots de pathogénicité : des "gros porteurs" de fonctions biologiques complexes :   | 52        |
| 3.6-Organisation modulaire des ICE :   | 53        |
| 3.6.1- Définition des modules :  | 54        |
| 3.6.2- Exemples d'échanges de modules :  | 54        |
| 3.6.3- Exemple d'évolution des modules de l'élément SXT de <i>V.cholerae</i> :   | 58        |
| 3.6.4- Conséquences de l'échange de modules :  | 60        |
| <b>Partie II : Partie expérimentale</b> :  | <b>65</b> |
| <b>1/ Introduction :</b>   | <b>66</b> |
| <b>2/ Résultats :</b>  | <b>70</b> |
| 2.1- Analyse de la séquence partielle de l'ICE de la souche 5632 de <i>M. agalactiae</i> :   | 70        |
| 2.2- Mise en évidence de la colinéarité des séquences 703 et 707 au locus chromosomique correspondant dans la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> : | 70        |
| 2.3- Identification par Southern blot des souches de la collection <i>M.agalactiae</i> et <i>M. bovis</i> qui possèdent l'ICE :                    | 71        |
| 2.4- Etude des sites de restriction de l'ICE chez la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> :  | 76        |
| 2.4.1- Confirmation de la présence des sites de restriction dans le génome de la souche 5632 :   | 79        |
| 2.4.2- Organisation des sites de restriction de l'ICE en dehors des sites <i>EcoRI</i> :   | 80        |
| 2.5- Etude des sites de restriction de l'ICE chez les souches 3990 et 8064 de <i>M.agalactiae</i> :  | 85        |
| <b>3/ Discussion :</b>   | <b>87</b> |
| 3.1- Particularités des souches de <i>M.agalactiae</i> comportant des homologies de séquences avec l'ICEF :  | 87        |
| 3.2- Particularités des souches de <i>M.bovis</i> comportant des homologies de séquences avec l'ICEF :   | 89        |
| 3.3-Comparaison des caractéristiques des souches comportant l'ICE de <i>M.bovis</i> et de <i>M.agalactiae</i> :                                    | 91        |
| 3.5-Limites et perspectives de notre étude :   | 93        |
| <b>4/ Conclusion :</b>   | <b>94</b> |
| <b>5/ Matériels et méthodes :</b>  | <b>96</b> |
| 5.1-Souches utilisées :  | 96        |
| 5.2-Oligonucléotides utilisés :  | 96        |
| 5.3- Les enzymes de restriction utilisées :  | 96        |
| 5.4- Les séquences d'ADN clonées utilisées :   | 101       |

|   |            |
|---|------------|
| 5.5- Les préparations d'ADN :.....  | 101        |
| 5.6- Les PCR réalisées au cours de cette étude:.....  | 101        |
| 5.6.1- PCR pour mettre en évidence la colinéarité au génome des séquences 703 et 707 :..... | 102        |
| 5.6.2- PCR pour l'obtention de sondes : .....   | 102        |
| 5.7- Digestions des ADN : .....   | 103        |
| 5.8- Southern blot réalisés au cours de cette étude : .....                                 | 104        |
| 5.8.1- Southern blot pour la caractérisation des souches possédant l'ICE :.....             | 104        |
| 5.8.2-Southern blot pour l'étude en dehors des bornes des séquences clonées : .....         | 104        |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....</b>   | <b>106</b> |

## Table des illustrations :

### Figures :

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Arbre phylogénétique des <i>Mollicutes</i> basé sur l'analyse des séquences de leur ARNr 16S d'après Barré et al .....                                       | 19 |
| Figure 2 : Mécanisme de clivage de MAV1 pendant son excision du chromosome de <i>M.arthritis</i> . .....  | 32 |
| Figure 3 : Modèle d'excision-intégration de l'ICEF d'après Calcutt et al 2002 .....   | 34 |
| Figure 4 : Représentation de l'étape de transfert et de la réplication de la forme circulaire intermédiaire d'un transposon conjugatif d'après Salyers et al 1995 ..... | 45 |
| Figure 5 : Représentation de l'arbre phylogénétique des ICE en fonction de trois ORF appartenant au module de conjugaison. ....   | 56 |
| Figure 6 : Représentation de l'arbre phylogénétique des ICE en fonction de leur recombinaise. ....  | 57 |
| Figure 7 : Etapes possibles d'acquisition et de perte des gènes de résistance aux antibiotiques proposées par Hochhut et al Nov 2001. ....                              | 59 |
| Figure 8 : Etapes du modèle de mobilisation proposées par Burrus et al 2004. ....   | 62 |
| Figure 9 : Organisation et comparaison avec l'ICEF de <i>M.fermentans</i> des séquences clonées 703 et 707.....   | 68 |
| Figure 10 : Positions des différentes sondes et amorces utilisées pour les différentes PCR....  | 69 |
| Figure 11 : Carte de restriction des séquences d'ADN 703 et 707 et positions des sondes utilisées pour reconnaître les différents fragments de restriction.....         | 69 |
| Figure 12 : Analyse par Southern blot avec la sonde ORF16 des 33 souches de la collection de <i>M.agalactiae</i> .....  | 74 |
| Figure 13 : Analyse par Southern blot avec la sonde ORF16 des 57 souches de <i>M.bovis</i> .....  | 74 |
| Figure 14 : Représentation de la position (pdb) des sites de restriction à l'extrémité 5' de l'ICE de la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> .....                       | 81 |
| Figure 15 : Représentation de la position (pdb) des sites de restriction à l'extrémité 3' de l'ICE de la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> . ....                      | 81 |
| Figure 16 : Illustration de l'analyse par Southern blot des simples digestions de la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> avec les sondes A, B, C38 et D. ....            | 83 |

## **Tableaux :**

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : Taxonomie et hôtes des mycoplasmes .....  | 16  |
| Tableau 2 : Espèces, affections principales et pouvoir pathogène des mycoplasmes rencontrés chez les petits ruminants .....   | 21  |
| Tableau 3 : Espèces, affections et pouvoir pathogène des mycoplasmes rencontrés chez les bovins .....   | 22  |
| Tableau 4 : Récapitulatifs des ICE connus.....  | 39  |
| Tableau 5 : Résultats des Southern blot sur la collection <i>M.agalactiae</i> . .....   | 72  |
| Tableau 6 : Résultats des Southern blot sur la collection <i>M.bovis</i> . .....  | 73  |
| Tableau 7 : Comparaison entre les tailles attendues (en kb) et estimées (en kb) des fragments de restriction de la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> reconnus par différentes sondes.....                                  | 77  |
| Tableau 8 : Comparaison entre les tailles attendues (en kb) et estimées (en kb) des fragments de restriction issus des doubles digestions de la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i> et reconnus par différentes sondes. .... | 78  |
| Tableau 9 : Taille (en kb) des fragments de restriction reconnus par différentes sondes pour la souche 3990 de <i>M.agalactiae</i> .....  | 84  |
| Tableau 10: Taille (en kb) des fragments de restriction reconnus par différentes sondes pour la souche 8064 de <i>M.agalactiae</i> .....  | 84  |
| Tableau 11 : Souches de <i>M.agalactiae</i> utilisées. ....   | 97  |
| Tableau 12 : Souches de <i>M.agalactiae</i> des Pyrénées Atlantiques utilisées. ....  | 98  |
| Tableau 13 : Souches de <i>M.bovis</i> utilisées. ....  | 99  |
| Tableau 14 : Oligonucléotides utilisés. ....  | 100 |
| Tableau 15 : Enzymes de restriction utilisées .....   | 100 |
| Tableau 16 : Amorces et matrices utilisées pour l'obtention des différentes sondes.....   | 103 |



## INTRODUCTION GENERALE :

Les mycoplasmes sont largement répandus dans la nature et parmi les 200 espèces connues de *Mollicutes* infectant les animaux, la majorité des mycoplasmes pathogènes appartient au genre *Mycoplasma* [49, 50]. Ces bactéries ont une affinité prononcée pour les épithéliums et induisent surtout des infections chroniques. Chez les ruminants, les atteintes de l'appareil respiratoire, du tractus urogénital, de la glande mammaire, mais également des articulations sont principalement observées. Les pertes économiques occasionnées par les mycoplasmes des ovins, caprins et bovins sont très importantes, alors que les moyens de lutte restent coûteux et peu efficaces [4]. Par exemple, l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* touchant les petits ruminants a un impact socio-économique important à l'échelon des filières laitières à cause de la perturbation de la production lactée des animaux infectés (allant de l'hypogalactie à l'agalactie). Les programmes sanitaires d'éradication sont basés sur le dépistage des porteurs asymptomatiques, sources principales de contamination. Chez les bovins aux USA, on estime que les mammites dues à *Mycoplasma bovis* sont responsables de \$108 millions de pertes par an et concerne 70 % des troupeaux. Le coût des infections respiratoires à *M.bovis* aux USA résultant de perte de GMQ et de dévalorisation des carcasses correspond à \$32 millions par an. En Europe, on estime qu'un tiers à un quart des troubles respiratoires des veaux est du à *M.bovis* ce qui est sans doute sous-estimé vu que peu de laboratoires recherchent cet agent [44].

Les caractéristiques génétiques et moléculaires de *M.bovis* et de *M.agalactiae* sont capitales pour fonder les stratégies de lutte contre ces infections. Une meilleure connaissance de leur génome pourrait permettre de savoir comment ces bactéries interagissent avec leur hôte et quels sont les déterminants de leur pouvoir pathogène. Plusieurs applications pourraient en découler, telles que (i) la fabrication de nouveaux vaccins ce qui constituerait un réel progrès car actuellement leur efficacité est insuffisante pour la prévention des infections mais également pour la réduction significative des signes cliniques ou (ii) l'amélioration des tests diagnostics. Ces derniers sont très importants pour entreprendre un traitement et/ou une démarche préventive adaptés. Or, les tests de diagnostic actuels posent encore quelques difficultés pour la différenciation entre *M.agalactiae* et *M.bovis*. Notamment, l'identification par PCR (Polymerase Chain Reaction), qui est largement utilisée en microbiologie vétérinaire, se heurte au manque de données sur les séquences de ces deux espèces, limitant le nombre de cibles utilisables pour le diagnostic différentiel par PCR de *M.agalactiae-M.bovis*. Historiquement, la détection par PCR de ces deux espèces reposait, comme pour beaucoup de

mycoplasmes, sur l'amplification de leur ARNr 16S, laquelle n'offre pas une spécificité d'espèce satisfaisante. En 1998, une PCR plus spécifique amplifiant les gènes *uvrC* est proposée par Subramaniam et al améliorant grandement le diagnostic différentiel entre *M.agalactiae* et *M.bovis*. Cependant, cette PCR donne des résultats ambigus pour certaines souches. Il s'est donc avéré nécessaire de trouver d'autres gènes cibles pour proposer des PCR capables de différencier les souches de *M.bovis* de celles de *M.agalactiae* sans ambiguïté. Dans ce but, l'hybridation suppressive soustractive (HSS) [10, 43] technique permettant d'identifier des séquences présentes dans un génome (tester) et pas dans l'autre (driver) a été utilisée pour comparer les génomes de la souche type PG45 de *M.bovis* et de la souche type PG2 de *M.agalactiae*. Des séquences spécifiques à chacune de ces souches types et présentes uniquement dans des isolats de la même espèce ont pu être mises en évidence. Une application de ce travail a été la mise au point d'un nouveau test de diagnostic différentiel par PCR basé sur l'amplification du gène de la DNA polymérase III [43].

De façon inattendue, au cours de la même étude, une séquence présente dans la souche type PG45 de *M.bovis* a retenu l'attention en raison de son homologie avec une portion d'un gène appartenant à l'ICEF (Integrative and Conjugative Element of *Mycoplasma fermentans*) découvert chez la souche PG18 de *M.fermentans* par Calcutt et al (2002). Chez *M.fermentans*, cet élément porte de multiples gènes associés avec la mobilité de l'ADN et la conjugaison. Les ICE ont été découverts récemment chez les bactéries, et seraient capables d'être transférés entre une cellule donneuse et receveuse sous forme circulaire. Ils pourraient alors participer à l'acquisition de nouveaux déterminants du pouvoir pathogène, à l'évolution et à la diversité des génomes et à la conquête de nouvelles niches écologiques. Le transfert d'ICE entre des mycoplasmes n'a pas encore été démontré expérimentalement, mais des transferts de gènes entre mycoplasmes ont été décrits chez *Mycoplasma pulmonis* [62] par un mécanisme qui n'est ni de la transformation ni de la transduction mais qui pourrait être de la conjugaison. Par ailleurs, le transfert d'ADN par conjugaison entre *Enterococcus faecalis* et *Mycoplasma hominis* a été démontré [54]. Il est donc possible que de tels systèmes existent et puissent être fonctionnels chez certaines souches de *M. agalactiae* et de *M. bovis*.

Au cours de ce travail, nous avons identifié trois souches de *M.agalactiae* et de nombreuses souches de *M.bovis* (dont la souche type PG45) qui portaient un élément similaire à l'ICEF. Nous avons également cherché à caractériser plus finement cet ICE de *M. agalactiae* et de *M. bovis*. L'ensemble de ces résultats sera décrit dans la deuxième partie de cette thèse.

## **PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Dans cette première partie, nous étudierons les points communs et les différences concernant *M.agalactiae* et *M.bovis*. L'identification d'un élément intégratif et conjugatif commun à ces deux espèces de mycoplasmes, phylogéniquement proches mais de spectre d'hôte différent, nous amène à nous intéresser à ce que l'on sait sur le transfert de gènes chez les mycoplasmes, et à dresser des hypothèses sur l'impact d'un tel élément au sein des souches du groupe *agalactiae-bovis*.

|  |
|--|
| <p><b>Ordre I : <i>Mycoplasmatales</i></b></p> <p><u>Famille I : <i>Mycoplasmataceae</i></u></p> <p>Genre I : <i>Mycoplasma</i> : 107 espèces (homme et animaux)</p> <p>Genre II : <i>Ureaplasma</i> : 7 espèces (homme et animaux)</p>  |
| <p><b>Ordre II : <i>Entomoplasmatales</i></b></p> <p><u>Famille I : <i>Entomoplasmataceae</i></u></p> <p>Genre I : <i>Entomoplasma</i> : 6 espèces (insectes et plantes)</p> <p>Genre II : <i>Mesoplasma</i> : 12 espèces (insectes et plantes)</p> <p><u>Famille II : <i>Spiroplasmataceae</i></u></p> <p>Genre I : <i>Spiroplasma</i> : 34 espèces (insectes et plantes)</p> |
| <p><b>Ordre III : <i>Acholeplasmatales</i></b></p> <p><u>Famille I : <i>Acholeplasmataceae</i></u></p> <p>Genre I : <i>Acholeplasma</i>: 14 espèces (homme, animaux, insectes et plantes)</p>  |
| <p><b>Ordre IV : <i>Anaeroplasmatales</i></b></p> <p><u>Famille I : <i>Anaeroplasmataceae</i></u></p> <p>Genre I : <i>Anaeroplasma</i> : 4 espèces (rumen des ruminants)</p> <p>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 mycoplasmes [49, 50].

## **1/ *M.agalactiae* et *M.bovis* : deux mycoplasmes de ruminants :**

*M.agalactiae* et *M.bovis* sont des bactéries qui appartiennent à la classe des *Mollicutes* (du latin *mollis* = molle, *cutis* = peau), à la famille des *Mycoplasmataceae*, au genre *Mycoplasma* (Tableau 1). Le terme « mycoplasme » a été retenu par l'usage courant pour désigner les membres appartenant à la classe des *Mollicutes*. Les mycoplasmes sont des procaryotes de petite taille sans paroi, qui passent au travers des filtres bactériologiques. L'absence de paroi explique la résistance aux antibiotiques qui dégradent ou inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (les  $\beta$ -lactamines : pénicillines et céphalosporines), mais cette absence les rend résistants aux UV, à la chaleur et aux détergents usuels. Ils ont un génome de petite taille (de 580 à 1 200 kilobases (kb)) avec une teneur faible en bases G+C (23 à 40 %) et possèdent des besoins nutritionnels inhabituels. Le genre *Mycoplasma* a un besoin strict de stérol exogène pour leur croissance en milieu anaérobie. Ces caractéristiques sont la base pour grouper les *Mollicutes* comme une classe distincte de procaryotes.

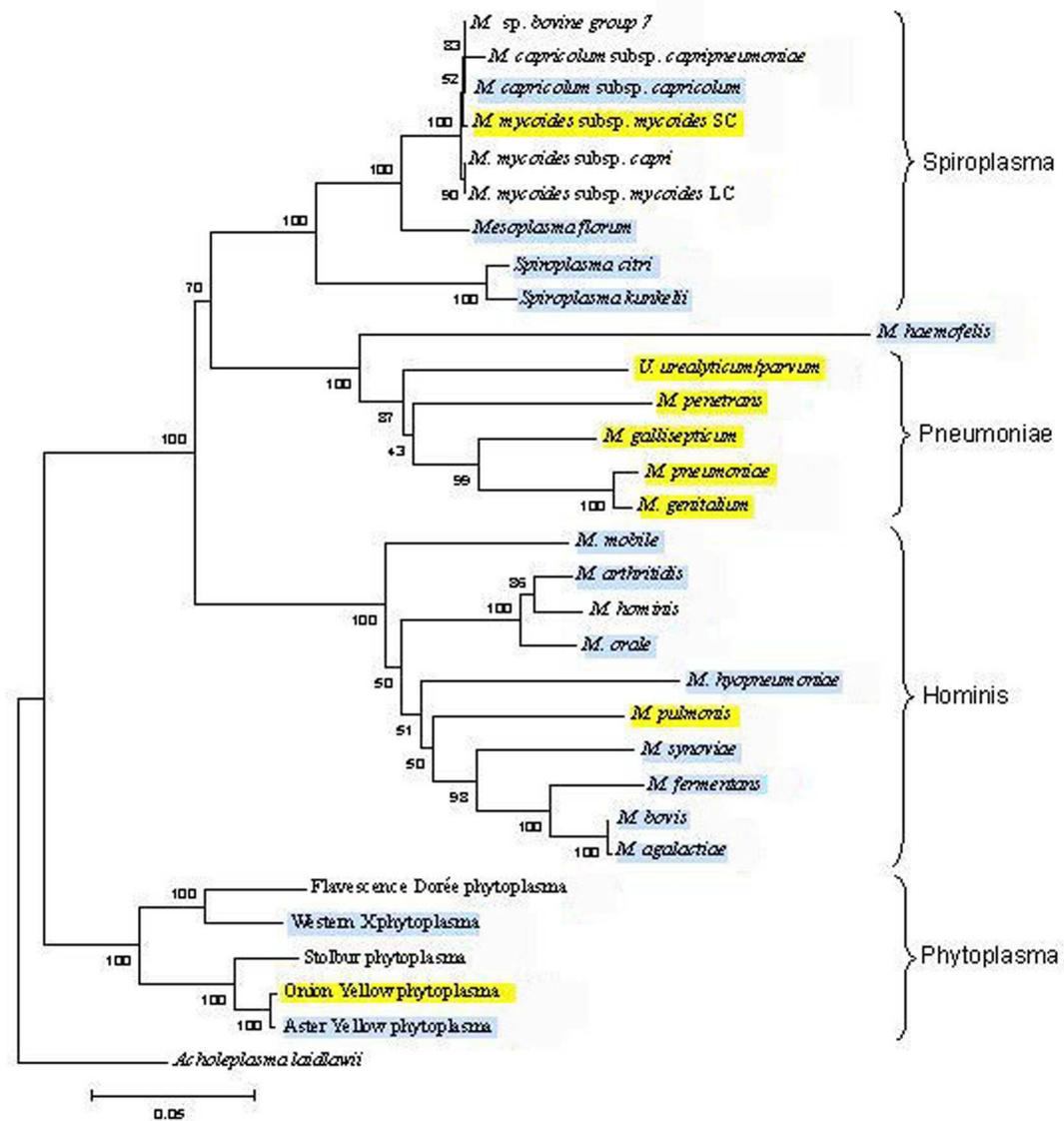
### **1.1- Taxonomie et phylogénie :**

Au sein du genre *Mycoplasma*, *M.agalactiae* et *M.bovis* sont deux espèces distinctes mais phylogénétiquement très proches, ce qui pose parfois des problèmes d'identification; d'ailleurs, jusqu'en 1973 ces deux espèces étaient confondues : *M.bovis* était appelé "*M.agalactiae* subspecies *bovis*" [28]. Cependant, leur différenciation est nécessaire pour pouvoir lutter efficacement contre ces mycoplasmoses et appliquer convenablement les mesures réglementaires spécifiques à chacune de ces espèces en fonction de la situation épidémiologique et de la nature de l'hôte contaminé. En routine, pour identifier les espèces appartenant au genre *Mycoplasma* infectant les ruminants, une des méthodes de choix est l'immunobinding dot ou MF-dot [47]. Cette méthode consiste à utiliser une batterie d'anticorps polyclonaux, chacun étant dirigé contre les antigènes totaux de la souche type d'une espèce et présentant une affinité pour les isolats de cette même espèce. La reconnaissance d'une culture mycoplasémique par l'un des sera de la batterie permet son identification à l'espèce correspondante. En cas de réaction croisée avec plusieurs sera, la réaction donnant l'intensité la plus forte est retenue pour le diagnostic. Le MF-dot est notamment utilisé pour l'identification d'isolats de terrain de *M. agalactiae* ou de *M. bovis*, en parallèle avec la PCR. Dans ce cas, les faibles différences entre les séquences de l'ARNr 16S de ces deux espèces (cf. infra) et les variations intraspécifiques entre les isolats d'une même

espèce sont à l'origine des difficultés d'interprétation des diagnostics basés sur les PCR utilisant les gènes codant pour l'ARNr 16S [34]. Dans la plupart des cas, l'utilisation d'une PCR basée sur le système de réparation de l'ADN codé par les gènes *uvrC* permet de différencier clairement *M.bovis* de *M.agalactiae* [63]. Les gènes *uvrC* ont une taille de 1 716 paires de base (pdb) et codent pour une protéine de 571 acides aminés. L'alignement des séquences génomiques de *M.bovis* et de *M.agalactiae* pour le gène *uvrC* montre 82,6 % d'identité au niveau de la séquence nucléotidique et 87,7 % d'identité au niveau de la séquence en acides aminés. Les profils de restriction des fragments amplifiés par PCR, obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *DdeI*, sont identiques pour toutes les souches de *M.agalactiae* et toutes les souches de *M.bovis*. Par contre, ce profil est différent entre les deux espèces de mycoplasmes [60].

Divers éléments de taxonomie et de phylogénie permettent de caractériser ces deux espèces. Le terme taxonomie est dérivé du grec *taxis* = ordre et *nomos* = loi. La taxonomie comprend trois domaines différents mais reliés entre eux : la classification, la nomenclature et l'identification. La taxonomie est donc la science dont l'objet consiste à nommer et à classer les êtres vivants. La classification des bactéries est difficile car elle ne peut pas reposer sur des caractéristiques morphologiques communes qui seraient le reflet de leur histoire évolutive. Actuellement, il est admis que deux souches appartiennent à une même espèce bactérienne si une homologie de séquences d'ADN d'au moins 70 % et un  $\Delta T_m$  de moins de 5 °C sont mis en évidence [50]. Dans notre cas, les hybridations ADN-ADN ont montré que les souches types PG2 de *M.agalactiae* et PG45 de *M.bovis* ont une homologie de 40 %, ce qui les place clairement dans deux espèces distinctes [48]. La phylogénie est la science qui étudie l'histoire évolutive d'une espèce ou d'un groupe d'espèces apparentés. Le but de la classification est d'introduire un système qui reflète les relations naturelles (ou phylogénie) des organismes. Il existe donc un lien entre la taxonomie et la phylogénie. La comparaison de l'ARNr 16S est un outil phylogénétique et de classification majeur. Tous les organismes capables de s'auto-reproduire possèdent un ou plusieurs ARNr 16S utilisés pour construire des arbres phylogénétiques dans lesquels plusieurs espèces sont susceptibles d'être incluses. La fonction de l'ARNr 16S est essentielle pour la traduction, de plus ce gène n'est pas transféré d'une souche à une autre ce qui le rend utile en tant qu'outil phylogénétique. Sa taille de 1 500 pdb permet d'utiliser la PCR pour les analyses de sa séquence [49, 50]. L'analyse de l'ARNr 16S révèle que les *Mollicutes* sont proches de bactéries Gram+ ayant un génome avec une faible teneur en bases G+C : ce qui correspond aux phénotypes de clostridies. Dans ce groupe, les *Mollicutes* sont proches du groupe bacilles-lactobacilles mais

ils sont plus particulièrement proches du sous-groupe représenté par *Clostridium innocuum* et *Clostridium ramosum*.



**Figure 1** : Arbre phylogénétique des *Mollicutes* basé sur l'analyse des séquences de leur ARNr 16S d'après Barré et al [2].

L'étude basée sur l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S de plus de 40 espèces de *Mollicutes* fournit les bases pour une analyse systématique de leur phylogénie (Figure 1). Cinq groupes de mycoplasmes sont reconnus [73, 2] :

- le groupe hominis qui inclue les espèces telles que *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma lipophilum*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma sualvi* et *Mycoplasma neurolyticum*
- le groupe pneumoniae qui inclue les espèces telles que *Mycoplasma muris* et *Mycoplasma pneumoniae*
- le groupe spiroplasma inclue les espèces telles que *Mycoplasma mycoïdes*, *Spiroplasma citri* et *Spiroplasma apis*
- le groupe anaeroplasmata qui contient les anaeroplasmata et acholeplasmata
- le groupe connu pour ne contenir que l'espèce *Asteroplasma anaerobium*

Cette analyse de la phylogénie basée sur l'ARNr 16S montre que *M.agalactiae*, *M.bovis* et *M.fermentans* sont d'un point de vue phylogénétique très proches (Figure 1). Ils appartiennent au groupe *hominis*, à la branche contenant l'espèce *M.lipophilum* [73] dont une caractéristique est la présence dans la séquence du gène de l'ARNr 16S d'une thymidine en position 912 à l'origine chez plusieurs espèces bactériennes de la résistance à la streptomycine [34]. L'analyse de la séquence de l'ARNr 16S des souches types de *M.agalactiae* et de *M.fermentans* a montré 95 % de similarité et celle de *M.agalactiae* et de *M.bovis* a montré 99,47 % de similarité [64, 48].

Ces deux espèces de mycoplasmes sont donc très proches d'un point de vue phylogénétique. Nous allons voir qu'il en est de même en ce qui concerne leur pouvoir pathogène.

## 1.2- Le pouvoir pathogène de *M.agalactiae* et de *M.bovis* :

Les ovins et les caprins tout comme les bovins abritent de nombreux mycoplasmes de pouvoir pathogène variable (Tableau 2 et Tableau 3).

| Espèce   | Hôte        | Affection   | Pouvoir pathogène |
|--|-------------|---|-------------------|
| <i>M.agalactiae</i>  | ovin/caprin | agalactie contagieuse                                   | majeur            |
| <i>M.arginini</i>  | ovin/caprin | pneumonie, mammite<br>arthrite, vaginite, conjonctivite | faible            |
| <i>M.capricolum</i> subspecies<br><i>capricolum</i>            | caprin/ovin | agalactie contagieuse<br>arthrite, mammite, pneumonie   | majeur            |
| <i>M.capricolum</i> subspecies<br><i>capripneumoniae</i> (F38) | caprin      | pleuropneumonie contagieuse<br>caprine                  | majeur            |
| <i>M.mycoides capri</i>  | caprin      | pneumonie, arthrite, mammite                            | modéré            |
| <i>M.mycoides</i> subspecies<br><i>mycoïdes</i> Large Colony   | caprin/ovin | agalactie contagieuse, arthrite                         | majeur            |
| <i>M.ovipneumoniae</i>   | ovin/caprin | pneumonie   | modéré à majeur   |
| <i>M.putrefaciens</i>  | caprin      | agalactie contagieuse, arthrite                         | modéré à majeur   |
| <i>Acholeplasma laidlawii</i>                                  |             | isolé dans les poumons                                  | non pathogène     |
| <i>Ureaplasma</i> species                                      | ovin/caprin | vaginite  | faible            |

**Tableau 2 :** Espèces, affections principales et pouvoir pathogène des mycoplasmes rencontrés chez les petits ruminants [6, 23].

| Espèce  | Affection   | Pouvoir pathogène          |
|---|---|----------------------------|
| <i>M.alkalescens</i>                                      | mammite   | faible                     |
| <i>M.arginini</i>   | isolé sporadiquement lors de mammite  | généralement non pathogène |
| <i>M.bovigenitalium</i>                                   | mammite, métrite  | modéré                     |
| <i>M.bovirhinis</i>                                       | isolé sporadiquement lors de mammite  | généralement non pathogène |
| <i>M.bovis</i>  | pneumonie, arthrite, mammite, méningite, métrite, otite, kérato-conjonctivite | majeur                     |
| <i>M.californicum</i>                                     | mammite aiguë   | modéré à majeur            |
| <i>M.canadense</i>  | mammite   | faible                     |
| <i>M.dipspar</i>  | mammite, pneumonie  | faible à modéré            |
| <i>M.mycoides</i> subspecies <i>mycoïdes</i> Small Colony | pleuropneumonie contagieuse bovine  | majeur                     |
| <i>Acholeplasma laidlawii</i>                             | isolé dans le lait  | non pathogène              |
| <i>Ureaplasma</i> species                                 | mammite, métrite  | faible                     |

**Tableau 3** : Espèces, affections et pouvoir pathogène des mycoplasmes rencontrés chez les bovins [23, 37].

Les mycoplasmes de pouvoir pathogène majeur chez les ruminants sont principalement:

- chez les bovins, *M.mycoides* subspecies *mycoïdes* Small Colony agent de la pleuropneumonie contagieuse bovine et *M.bovis* responsable entre autres de pneumonie.
- chez les ovins et caprins, *M.agalactiae* et *M.mycoides* subspecies *mycoïdes* large Colony, responsables de l'agalactie contagieuse, et *M.capricolum* subspecies *capripneumoniae* agent de la pleuropneumonie contagieuse caprine.

Nous n'aborderons que l'agalactie contagieuse à *M.agalactiae* des ovins et les mycoplasmoses à *M.bovis* des bovins. Ces deux espèces font partie des mycoplasmes infectant les ruminants les plus étudiées car leur impact économique est important, leur diagnostic est difficile et les traitements sont souvent inefficaces.

### 1.2.1- Les mycoplasmoses dues à *M.agalactiae* et *M.bovis* :

#### 1.2.1.1- Importance de ces deux mycoplasmoses :

En France, une enquête sérologique réalisée dans plusieurs départements entre 1988 et 1990 par Poumarat, révèle que le taux d'infection à *M.bovis* est proche de 10 % et celui des troupeaux proche de 40 %. Mais il faut savoir que les techniques utilisées ne permettent d'avoir qu'un ordre de grandeur car la grande variabilité génétique de ces mycoplasmes peuvent être à l'origine de résultats faussement négatifs [47]. *M.bovis* est isolé en France chez 30 % des veaux atteints de pneumonies et en Grande Bretagne 20 à 25 % des troupeaux ont des animaux atteints de pneumonies possédant des titres élevés en anticorps dirigés contre *M.bovis* [44].

*M.agalactiae* est à l'origine de mammites accompagnées d'une diminution rapide de la production de lait : de 1,5 litres de lait à la traite du matin au volume d'un dé à coudre à la traite du soir. L'importance du syndrome engendré par *M.agalactiae* est soulignée par le fait qu'il est inscrit sur la liste B de l'OIE (Office International des Epizooties) ; cette liste regroupe les maladies transmissibles considérées comme importantes d'un 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.

#### 1.2.1.2- Epidémiologie :

*M.bovis* est ubiquiste et largement répandu dans la population bovine des cinq continents sous forme enzootique dans les régions infectées. En ce qui concerne *M.agalactiae*, 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 *M.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 [4].

Lors d'infection à *M.bovis* ou à *M.agalactiae*, les porteurs sains peuvent héberger la bactérie pendant des mois voire des années. Ils jouent le rôle de réservoir du germe comme les animaux malades, convalescents, en incubation sans oublier le milieu extérieur [44]. Les principales voies de contamination sont orales, respiratoires et mammaires. Lors de mammites, la traite semble être un moyen rapide d'extension au reste du troupeau. La

dissémination par voie hématogène de *M.bovis* vers la mamelle à partir d'autres sites corporels, comme l'appareil respiratoire est une hypothèse avancée pour expliquer les mammites à mycoplasmes dans les élevages où aucune introduction récente d'animaux n'a été effectuée [37].

Il est clairement établi que *M.bovis* est un agent initiateur de pneumonie en compromettant les défenses immunitaires de l'hôte et en favorisant l'intervention d'agents secondaires. Dans une étude portant sur des veaux morts de pneumonie, un tiers des poumons était infecté par *M.bovis* alors que les deux tiers restants présentaient une double contamination par *M.bovis* et *Pasteurella multocida* et/ou *Haemophilus somnus* et/ou *Mannheimia haemolytica*. Bien que le spectre d'hôte de *M.bovis* soit limité aux bovins, il a été occasionnellement isolé chez des buffles, des petits ruminants et même l'homme [44].

En ce qui concerne les mammites à *M.bovis* ou à *M.agalactiae* le stade ou le rang de lactation n'intervient pas. La maladie peut en effet concerner les primipares ou les multipares, ainsi que les animaux taris ou en lactation (particulièrement en début de lactation). Dans les troupeaux nouvellement infectés, les cas sont nombreux et sévères [37]. L'extension de la maladie est rapide. Après une flambée de mammites cliniques, la maladie prend un caractère enzootique et chronique, l'infection devient alors inapparente et les quelques cas cliniques qui surviennent sporadiquement sont de moindre intensité.

#### 1.2.1.3- Tableau clinique :

Le tropisme de ces deux mycoplasmoses est différent en fonction de l'âge des individus atteints. Chez le veau et les jeunes bovins, *M.bovis* entraîne l'apparition de pneumopathies entrant dans le syndrome des broncho-pneumonies infectieuses bovines et d'arthrites. Chez les adultes, cette infection s'exprime cliniquement sous la forme de mammites graves, d'arthrites, d'avortements et plus rarement d'abcès sous-cutanés, de kérato-conjonctivites, de méningites ou d'otites [6, 40]. Quant à l'agalactie contagieuse, elle se présente, à l'échelon collectif, sous trois formes cliniques principales : mammaire, articulaire et oculaire, n'excluant pas une atteinte respiratoire ou génitale. Des formes partielles ou frustes peuvent exister. Les pneumonies et les septicémies sont plus fréquentes chez les jeunes. Chez les adultes, l'atteinte articulaire prédomine et chez les femelles en lactation l'atteinte mammaire est plus fréquente que l'atteinte articulaire [4].

#### 1.2.1.4- Diagnostic :

Le prélèvement de choix pour ces deux mycoplasmoses lors de mammites est le lait individuel ou de tank. Les prélèvements oculaires, synoviaux ou respiratoires sont également intéressants. L'envoi au laboratoire se fait sous couvert du froid positif (+ 4°C).

L'isolement de tout mycoplasme doit être obligatoirement suivi d'une identification car toutes les espèces ne sont pas pathogènes. L'identification est effectuée par méthode immuno-enzymatique. Cette méthode consiste à fixer des mycoplasmes sur une membrane par filtration sous vide, et de les identifier avec des anticorps polyclonaux. Actuellement, elle est centralisée à l'AFSSA de Lyon à l'unité de mycoplasmologie. La PCR utilisée pour l'identification de *M.agalactiae* et de *M.bovis* est basée sur l'amplification de l'ARNr 16S mais récemment une PCR plus spécifique basée sur la reconnaissance des gènes *uvrC* a été développée. Son application à des prélèvements biologiques tels que le lait connaît encore quelques difficultés et des travaux sont en cours afin d'adapter la PCR à une application directe sur le lait. Le dépistage sérologique de *M.bovis* et de *M.agalactiae* par ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) est intéressant pour plusieurs raisons. Les anticorps sont détectés à des niveaux acceptables pendant plusieurs mois ce qui permet de proposer un diagnostic même si les animaux ont été traités avec des antibiotiques ou si l'atteinte est chronique (dans ce cas l'isolement est difficile) [44]. Pour l'agalactie contagieuse, 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.

#### 1.2.1.5- Traitements et prophylaxie :

Il semblerait que les souches européennes de *M.bovis* soient résistantes à l'oxytétracycline, la tilmicosine et la spectinomycine. Les fluoroquinolones sont efficaces [44]. Les principaux antibiotiques utilisés pour lutter contre l'agalactie contagieuse sont les macrolides, les tétracyclines, et plus, récemment, les fluoroquinolones. Des travaux italiens ont montré que les CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) les plus basses étaient obtenues avec la tiamuline, la tylosine, la spiramycine, la lincomycine, la danofloxacin et l'enrofloxacin. Pour certaines souches de *M.agalactiae* des CMI élevées ont été signalées pour l'oxytétracycline, la spectinomycine, voire la tilmicosine et le florfenicol [4].

Actuellement, aucun vaccin n'est disponible et les perspectives vaccinales restent lointaines. Cependant, des vaccins inactivés saponifiés expérimentaux ont montré une protection contre les maladies respiratoires à *M.bovis*.

Le contrôle des mammites passe par la réforme et le dépistage des animaux atteints, l'hygiène de traite et la connaissance du statut sanitaire des animaux introduits dans l'exploitation [37]. Le contrôle des troubles respiratoires des veaux devrait inclure des mesures visant à réduire les stress et assurer des conditions environnementales adéquates ainsi que la séparation des animaux jeunes et adultes.

Pour l'agalactie contagieuse en France, trois départements ont opté pour une prophylaxie purement sanitaire : les Pyrénées Atlantique, la Savoie et la Haute Savoie. Le programme de maîtrise sanitaire développé dans les Pyrénées-Atlantiques repose sur :

- la déclaration obligatoire des suspicions cliniques et la confirmation au laboratoire.
- la qualification annuelle exhaustive des cheptels par l'indice sérologique (vingt animaux par troupeau ou lot), les données épidémiocliniques et pour certaines zones, la bactériologie sur laits de tanks.
- l'incitation à l'abattage total et au renouvellement subventionnés (à défaut isolement strict).
- la gestion des transactions et des mouvements d'animaux en fonction de ces qualifications (et des sérologies supplémentaires pour les achats) : transhumance estivale ou mise en pension hivernale raisonnées en fonction du statut des troupeaux, même si certaines nuances existent d'une vallée à l'autre, avec possibilité d'aides financières lors d'isolement.

L'application d'un tel plan a autorisé une diminution de la prévalence de 10 % à approximativement 1 % en une dizaine d'années dans les Pyrénées Atlantiques [4].

### **1.2.2- Les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *M. agalactiae* et de *M. bovis* : de la découverte de facteurs de virulence au transfert de gènes de pathogénicité :**

Nous venons de voir que *M.bovis* et *M.agalactiae* sont très proches d'un point de vue épidémioclinique. En ce qui concerne les bases moléculaires de leur pouvoir pathogène peu

de choses sont connues. Chez la plupart des bactéries pathogènes, les bases de la virulence sont la production de composés cytotoxiques, de facteurs d'adhésion et d'invasion cellulaire, et l'adaptation à l'environnement de l'hôte (incluant ses mécanismes de défense). Il est généralement décrit que les signes observés lors d'infections à mycoplasmes sont le résultat de l'interaction de l'agent avec la réponse inflammatoire de l'hôte et le système immunitaire, plutôt que de l'effet de toxines directement produites et sécrétées [45]. La synthèse de toxines n'a d'ailleurs jamais été mise en évidence chez les mycoplasmes. Cependant, les produits intermédiaires de leur métabolisme peuvent être toxiques, comme le peroxyde d'hydrogène et les radicaux superoxydes qui sont à l'origine de dommages des membranes cellulaires de l'hôte [50].

L'adhésion des *Mollicutes* aux cellules de l'hôte est un prérequis pour la colonisation et l'infection. Par exemple, la perte des capacités d'adhésion par mutations concernant les protéines P1, B, C, P65, HMW1, HMW2 et HMW3 de *M.pneumoniae* est à l'origine d'une perte d'infectivité [35, 36]. L'adhésine P1 est une des adhésines majeures de *M.pneumoniae*. *M.genitalium*, *M.gallisepticum* et *M.pirum* possèdent des protéines homologues à la protéine P1. Bien que les adhésines jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire, il semble que ce phénomène soit multifactoriel impliquant un nombre important de protéines accessoires. Des études ont montré que chez *M.pirum*, *M.genitalium*, *M.pneumoniae* et *M.gallisepticum* ces protéines accessoires agissent de concert avec les éléments du cytosquelette dans le but de faciliter la concentration des molécules d'adhésines vers un pôle de la cellule pour la formation d'une structure tip. Encore peu d'éléments relatifs à l'adhésion cellulaire sont connus chez *M.agalactiae* et *M.bovis*. Il existe chez ces deux espèces des systèmes homologues codant pour des lipoprotéines de surface, les Vpma chez *M.agalactiae* et les Vsp chez *M.bovis*, qui comportent de nombreuses similitudes en termes d'organisation et de fonctionnement. Quelques données expérimentales suggèrent que les Vsp pourraient jouer un rôle d'adhésine [57]. Par ailleurs, les Vpma et les Vsp sont des antigènes d'expression hypervariable qui pourraient également être impliqués dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte. Enfin, chez *M.agalactiae*, une protéine membranaire appelée P40 a été identifiée et caractérisée. Cette protéine est responsable de l'adhésion de *M.agalactiae* à des cellules de la membrane synoviale de moutons [26].

Dans d'autres espèces de mycoplasmes, des phages peuvent jouer un rôle dans le pouvoir pathogène. Bien que peu de données soient disponibles à ce sujet chez *M. agalactiae* et *M. bovis*, il est intéressant de remarquer qu'un des ORF de l'ICE découvert chez *M.agalactiae*, code potentiellement pour un produit homologue à une protéine de phage identifiée chez *M. mycoïdes mycoïdes* SC (Cf. II/2.1 : Analyse de la séquence partielle de

l'ICE de la souche 5632 de *M. agalactiae*). Le bactériophage lysogénique MAV1 infectant *Mycoplasma arthritidis* joue un rôle dans la pathogénicité de ce mycoplasme murin. Toutes les souches virulentes de *M. arthritidis* porte l'ADN de MAV1 intégré en différents sites alors que les souches avirulentes n'ont pas cet ADN. Le mécanisme par lequel MAV1 rend ces souches pathogènes n'est pas connu. Le fait que plusieurs souches ne portant pas le génome de MAV1 ne soient pas complètement avirulentes suggère que l'intégration de MAV1 active d'autres facteurs de virulence, tels que le superantigène MAM ou augmente l'expression des adhésines de *M. arthritidis* [50]. Chez *M. fermentans* une espèce proche de *M. agalactiae* et de *M. bovis*, l'ADN du phage MFV1, un phage proche de MAV1, a été caractérisé. Un produit des ORF du génome de ce phage code pour une lipoprotéine appelée Mem de fonction inconnue [55].

Dans leur ensemble, ces données soulèvent la question de l'origine et de la dissémination de facteurs de virulence au sein de populations de mycoplasmes. Ceci pose alors le problème de la co-existence de différentes populations infectantes au sein d'un même hôte. Bien que *M. bovis* et *M. agalactiae* présentent un spectre d'hôte différent, de rares cas d'isolement de *M. agalactiae* chez des bovins, ou de *M. bovis* chez des petits ruminants ont été rapportés. Théoriquement, il ne serait donc pas impossible d'envisager une co-infection par ces deux germes sur un même animal. Les co-infections ne sont, par ailleurs, pas exceptionnelles, en particulier chez les caprins : les associations de mycoplasmes responsables de l'agalactie contagieuse peuvent être mises en évidence sur un même animal (il s'agit le plus souvent d'une association *M. agalactiae* et *M. mycoides* subspecies *mycoides* Large Colony). Mais est-il possible pour les mycoplasmes au cours de ces co-infections d'agir en synergie, de s'échanger des gènes et/ou des facteurs de virulence ? Le transfert in vitro d'ADN est suggéré chez *M. pulmonis* [62] mais n'a pas été démontré ni chez *M. agalactiae*, ni chez *M. bovis* mais il peut être envisagé avec la mise en évidence de l'ICE. Nous allons voir ce que l'on connaît sur les transferts de gènes chez les mycoplasmes pour comprendre l'implication de tels systèmes chez *M. bovis* et *M. agalactiae*.

## **2/ Transfert de gènes et éléments extrachromosomiques chez les mycoplasmes:**

L'absence de paroi chez les *Mollicutes* devrait faciliter l'introduction d'ADN exogène dans ces cellules. En fait, les essais pour faire entrer de l'ADN dans ces bactéries ont démontré que l'efficacité et la fréquence de ces transferts étaient faibles. Il semble que ces études génétiques aient été gênées par le manque de marqueurs adaptés. Cependant, il est évident que des transferts horizontaux de gènes aient lieu chez les mycoplasmes. Par exemple,

la séquence d'insertion *IS1221* est retrouvée chez *M.hyorhinis*, *M.hypopneumoniae* et *M.flocculare*. Ces trois espèces sont toutes des parasites de porc et on suppose que cette IS pourrait avoir été transférée par des échanges de gènes horizontaux suite à son insertion dans un plasmide ou un phage chez l'hôte lors de co-infection par ces trois espèces [62]. La transformation, la transduction et la conjugaison sont les trois principaux mécanismes à l'origine des échanges horizontaux de gènes chez les bactéries, sans oublier la transposition qui permet la mobilisation de gènes à l'intérieur du génome d'une bactérie. Nous allons voir ce qu'il en est chez les mycoplasmes.

## 2.1- Transformation :

La transformation correspond aux phénomènes qui permettent à une cellule d'incorporer du matériel génétique exogène. Chez les *Mollicutes*, l'ADN de virus, des transposons et des plasmides ont été intégrés expérimentalement dans le chromosome de mycoplasmes.

La transformation d'*Acholeplasma laidlawii* par l'ADN du virus L2 a été le premier transfert mis en évidence chez un membre de la classe des *Mollicutes* [49]. Ce transfert a nécessité la présence de polyéthylène glycol (PEG) [42].

Le transposon *Tn4001* porté par le plasmide pIVC-1 a pu être transféré dans plusieurs espèces de mycoplasmes incluant *M.gallisepticum*, *M.pneumoniae* et *M.genitalium*. L'intégration du transposon *Tn4001* dans le chromosome de *M.pulmonis* n'avait pu être mise en évidence certainement à cause de l'échec de l'expression du gène porté par *Tn4001* codant pour la résistance à la gentamycine. L'ajout à ce transposon d'un gène codant pour la résistance à la tétracycline a permis de mettre en évidence les *Tn4001* ayant été intégrés dans le chromosome de *M.pulmonis* [24]. La transformation de *M.pulmonis* et de *A.laidlawii* par le transposon *Tn916* est aussi possible. Ce transposon comme le *Tn4001* peut s'exciser du plasmide dans lequel il est intégré et s'insérer au hasard dans le chromosome de son hôte. La transformation par le transposon *Tn916*, en présence de PEG, de la souche H6061 de *M.arthritis* est possible mais pas avec les autres souches de *M.arthritis*. Pour expliquer ce résultat, l'hypothèse suivante a été émise : les souches non transformées posséderaient des systèmes de modification et de restriction différents des souches transformées, ou différeraient par l'expression de ces gènes. La comparaison de la souche H6061 aux autres souches a permis de mettre en évidence, chez les souches non transformables, une endonucléase *AluI* qui clive les codons AGCT non méthylés [68].

On a introduit par électroporation chez *Spiroplasma citri* un plasmide construit avec un gène de résistance à la tétracycline et l'*OriC* du génome de cette bactérie [51]. Les plasmides pADP201 et pKMK1 de *M.mycoïdes* subspecies *mycoïdes* sont parmi les seuls plasmides connus et identifiés dans le genre *Mycoplasma*. Le plasmide pKMK1 a été utilisé pour la construction de vecteurs de clonage [33]. Le plasmide pKMK1 auquel sont rajoutés un réplicon d'*E.coli* et le gène de résistance à la tétracycline a pu être introduit dans *E.coli* et *M.mycoïdes* sans délétion ou réarrangement de ce plasmide.

La méthode de choix pour la transformation des *Mollicutes* dépend des souches et espèces étudiées et de la particularité de l'ADN utilisé. Par exemple, l'électroporation est une méthode plus efficace que celle utilisant le PEG pour la transformation de *M.pneumoniae* alors que la transformation avec du PEG peut être parfois plus efficace pour la transformation de *M.pulmonis* [51].

## 2.2- Transduction :

La transduction correspond au transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de virus. Parmi les *Mollicutes*, alors que de nombreux virus capables d'infecter les spiroplasmes et les acholeplasmes sont connus, seuls quatre virus ont été isolés et identifiés au sein du genre *Mycoplasma*. La morphologie de ces virus et les cycles d'infection n'ont pas été étudiés. Le transfert d'ADN génomique entre mycoplasmes via ces virus n'a pas été démontré expérimentalement mais le rôle et les propriétés de quelques virus ont été déterminés.

SpV1 infecte *Spiroplasma citri* [52]. Ce virus possède un ADN sous forme simple brin d'approximativement 8 kb. La séquence nucléotidique et l'organisation des gènes de deux isolats de SpV1 : SpV1-R8A2B et SpV1-C74 ont été déterminées. Le produit de l'ORF3 de SpV1-R8A2B est homologue à ceux des transposases de la famille des séquences d'insertion IS30 et celui de SpV1-C74 avec la famille des séquences d'insertion IS3. On ne connaît pas la fonction de l'insertion de ce virus dans le chromosome de *S.citri*. Cependant, le nombre et le polymorphisme des différents fragments de restriction parmi les différentes souches de *S.citri* suggèrent que les séquences virales, considérées comme des éléments répétés, joueraient un rôle dans les réarrangements chromosomiques et l'expression des gènes [51].

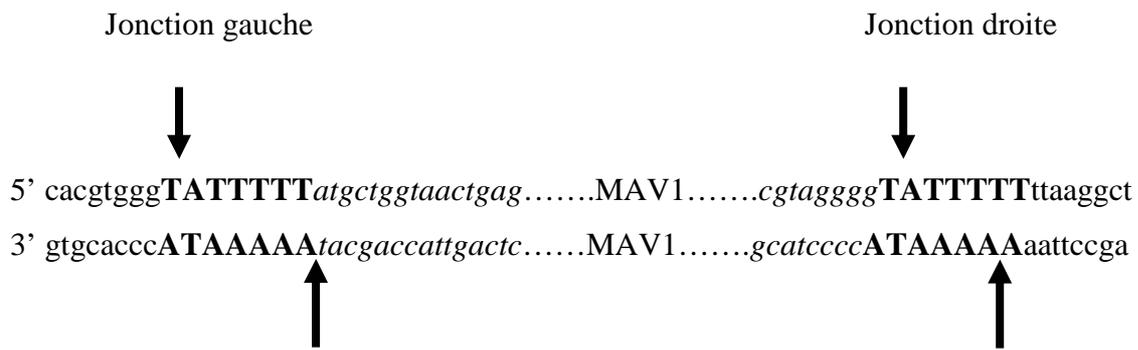
Le virus P1 de *M.pulmonis* est un virus apparemment non lysogène à ADN double brin de 11 660 pb avec des séquences terminales inversées. Une protéine terminale est attachée à l'extrémité 5' de cet ADN ce qui permet de la protéger de l'action des exonucléases  $\lambda$  [66]. Ce virus partage les caractéristiques des phages de la famille *Podoviridae*, infectant

des bactéries Gram+ phylogénétiquement proches des *Mollicutes*. Le séquençage complet de ce virus a permis d'identifier 11 ORF, dont les produits ne présentent aucune homologie significative avec des séquences connues, à l'exception du produit de l'ORF8. Le produit de cet ORF serait impliqué dans l'interaction avec la protéine VsaA de l'hôte, protéine apparemment requise pour l'adsorption du virus [25, 66].

Le virus MFV1 de *M.fermentans* est un virus à ADN de 16 kb [55]. MFV1 est intégré dans le génome de *M.fermentans* en différents sites et parfois en multiples copies, chaque copie est caractérisée par une séquence cible conservée TTTTTA résultant de la duplication des séquences cibles lors de l'intégration. L'ADN de ce virus est mobile et se réplique sous une forme extrachromosomique. L'ADN de ce virus comporte 18 ORF dont la plupart ont des fonctions en relation avec la biologie des phages. Mais un des produits de ces ORF code pour une lipoprotéine de surface appelée Mem. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans la survie et l'adaptation de cette bactérie à son environnement. Le génome de ce virus est très proche de celui du virus MAV1 de *M.arthritis* ce qui permet de mettre en évidence une nouvelle famille de prophages au sein du genre *Mycoplasma* [55].

MAV1 est un virus de mycoplasme associé à *M.arthritis*. La génome de MAV1 comporte 29 % de bases G+C ce qui est légèrement inférieur aux 30-33 % de bases G+C du génome de *M.arthritis*. Les souches très pathogènes pour les articulations du rat possèdent l'ADN de ce virus en différents sites ce qui n'est pas le cas des souches peu virulentes. Ce virus est résistant à l'action de la protéinase K et contient un ADN double brin linéaire de 16 kb [69]. Le séquençage du génome de MAV1 a permis d'identifier 15 ORF. Un de ces ORF, appelé *vir*, code pour une lipoprotéine de surface de poids moléculaire de 25,4 kDa. Cette lipoprotéine est supposée intervenir dans le pouvoir pathogène de *M.arthritis* par des modalités encore inconnues [70]. Le modèle excision-intégration du génome de ce virus ressemble beaucoup à celui du transposon conjugatif Tn916 [69] :

- à l'extrémité droite de ce génome, un ORF dont la séquence montre une forte similarité avec l'intégrase du transposon conjugatif Tn916 est présent.
- comme pour ce transposon, le génome de ce virus semblerait s'exciser pour former un intermédiaire circulaire.
- l'excision du génome de ce virus crée de chaque côté un simple brin d'ADN de 6 pdb.



**Figure 2 :** Mécanisme de clivage de MAV1 pendant son excision du chromosome de *M.arthritis*.

Les lettres en italique correspondent au génome de MAV1, les lettres en minuscule correspondent au génome de *M.arthritis*. Les flèches indiquent les sites de clivage [69].

-chaque site d'intégration comporte la séquence consensus 5'-TATTTTT-3', indiquant que l'intégration de ce virus est site-spécifique [71].

### 2.3- Conjugaison :

La conjugaison est un transfert de matériel génétique entre deux bactéries temporairement liées. Le transfert de gènes intra-espèces a d'abord été démontré chez *Spiroplasma citri* et ensuite chez *Acholeplasma oculi*. Cependant, le mécanisme de transfert de gènes n'a toujours pas été déterminé. On ne sait pas si ce transfert résulte d'une fusion de membrane ou utilise un mécanisme de conjugaison à proprement parler avec formation d'un pore et échange de matériel génétique.

Le transfert du gène de résistance à la tétracycline entre *Enterococcus faecalis* et *M.hominis* a été réalisé avec le transposon conjugatif Tn916 avec une fréquence de  $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  (ce qui est assez faible) [54]. Ce transposon conjugatif possède un spectre d'hôte large car il peut être transféré entre des souches de streptocoques et à d'autres bactéries Gram+ comme *Bacillus anthracis* et *Listeria monocytogenes* [54]. Le transfert de Tn916 de *M.hominis* dans *E.faecalis* n'a pas été mis en évidence. Le transfert de ce transposon n'est pas site spécifique puisqu'il a été retrouvé dans plusieurs sites. Une ou plusieurs copies peuvent être transférées.

Le transfert de gènes a aussi été étudié entre des souches de *M.pulmonis* avec des souches contenant un transposon possédant des gènes de résistance à la tétracycline et au chloramphénicol [62]. L'analyse des bactéries filles, obtenues après le transfert, a montré que

seul le transposon était transféré. Il est improbable que le mécanisme de transfert de gènes soit de la transduction ou de la transformation. La résistance du transfert de gènes à l'action de la Dnase I, la nécessité que les deux souches parentales soient viables et l'absence d'identification de plasmide chez *M.pulmonis* sont des arguments à l'encontre d'un phénomène de transformation. En ce qui concerne la transduction, les souches utilisées pour cette étude n'étaient pas des hôtes de bactériophages. Le transfert de gènes s'est donc effectué soit par un contact direct entre cellules, soit par la fusion complète ou partielle des deux membranes cellulaires des cellules receveuses et donneuses afin d'obtenir une seule cellule avec deux chromosomes. Dans ce cas aussi, les transferts étaient de faible fréquence (de  $10^{-5}$  à  $10^{-8}$  transconjugants par UFC).

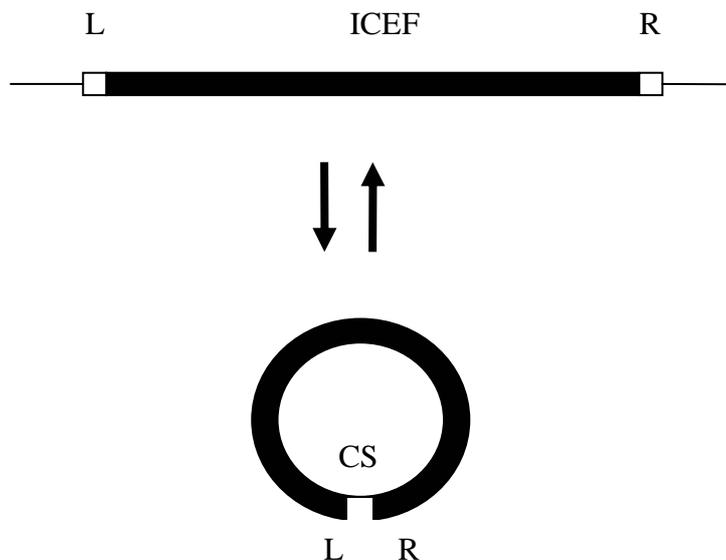
#### **2.4- Transposition :**

La transposition correspond à la mobilisation d'éléments génétiques directement d'un site génomique à un autre. Ces éléments sont appelés transposons ou séquences d'insertion (IS). Ces IS sont des constituants normaux des chromosomes bactériens et des plasmides. Les IS sont des éléments autonomes présents en multiples copies dans le chromosome qui codent pour une transposase et toutes les autres protéines nécessaires à leur propre mobilisation. Certains transposons sont plus complexes et possèdent d'autres gènes comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques. Dans ce cas, on parle de transposons composites. Les terminaisons de l'IS sont caractérisées par la présence de courtes séquences inversées répétées de 9 à 23 pdb. Lors de l'insertion de l'IS, une séquence de l'hôte est dupliquée au niveau du site cible. La nature de la duplication est révélée par la comparaison des séquences avant et après l'insertion de l'IS. Avant l'insertion, le site cible ne possède qu'une seule séquence et après la transposition cette copie est présente en double exemplaire de chaque côté du transposon. Cette séquence est une séquence directe répétée variable entre chaque famille d'IS mais de taille constante pour une IS donnée. La taille la plus fréquemment rencontrée est de 9 pdb. Les mécanismes de transposition peuvent être répliatifs ou non-répliatifs. Dans le cas d'une transposition répliatif, l'élément est dupliqué au cours de la réaction, ainsi l'élément transposé n'est qu'une copie du transposon original. Lors de transposition non-répliatif, l'élément est mobilisé en tant qu'entité physique directement d'un site à un autre [38].

Chez les mycoplasmes, la plupart des IS connues appartiennent à la famille IS3 [41] : IS1138 de *M.pulmonis* (le seul pour lequel une capacité de transposition autonome a été démontrée), IS1221 de *M.hyorhinis*, *M.flocculare* et de *M.hypopneumoniae*, IS1296 de *M.mycoides* et ISMi1 de *M.fermentans*. Les membres de cette famille sont caractérisés par

une taille de 1 200 à 1 550 pdb et des séquences terminales inversées répétées de 20 à 40 pdb. Les seules IS de mycoplasmes qui n'appartiennent pas à cette famille sont l'IS1634 de *M.mycoides* qui appartient à la famille IS4, l'ISMag1 de *M.agalactiae* [46] et l'IS1630 de *M.fermentans*. Ces deux derniers appartenant à la famille IS30 [16, 41, 46]. Cette famille est caractérisée par la présence de séquences directes répétées de faible taille, variant de 2 à 3 pdb ce qui est un cas particulier au sein des familles d'IS [41]. Cependant, les séquences directes répétées de l'IS1630 ont une taille comprise entre 19 et 26 pdb.

Un élément particulier a été mis en évidence chez la souche PG18 de *M.fermentans* [17]. Il s'agit d'un ICE c'est-à-dire un élément conjugatif et intégratif. En effet, dans le génome de ce mycoplasme quatre copies d'un élément mobile capable de se circulariser sont présentes. Ces quatre copies représentent environ 8 % du génome. Les séquences terminales droite (R) et gauche (L) de cet ICE se juxtaposent pour aboutir à une forme circulaire et forment ce que l'on appelle une séquence couplée (coupling sequence : CS) dérivée des séquences directes répétées flanquant les différentes copies de l'ICE (Figure 3). Ces séquences directes répétées résultent de la duplication du site cible.



**Figure 3 :** Modèle d'excision-intégration de l'ICEF d'après Calcutt et al 2002

Contrairement à d'autres, cet ICE ne possède aucune séquence codant pour des transposases, intégrases ou recombinaisons connues ce qui suggère qu'une nouvelle enzyme est peut être utilisée pour l'intégration et l'excision de cet ICE. Cet ICE s'insère en différents sites témoignant peut être de son implication dans la variation phénotypique et génomique de cette espèce [17]. Sur les quatre copies identifiées pour cette souche, trois copies se sont

insérées dans ou à proximité d'une IS. En effet, deux copies sont insérées dans l'*ISM<sub>1</sub>* et une troisième copie est insérée à proximité de l'*ISM<sub>2</sub>*.

La présence d'un élément similaire a été mise en évidence chez *M.agalactiae* et *M.bovis*. Pour comprendre la portée de cette découverte et savoir ce que peut signifier la présence d'un ICE chez ces deux espèces nous aborderons en détails les particularités de ces éléments.

### **3/ Les éléments conjugatifs intégratifs (ICE) :**

Ces éléments ont été découverts dans les années 70 par deux laboratoires qui travaillaient sur les coques Gram+. Il s'agissait de Tn916 découvert chez la souche DS16 d'*E.faecalis*. Depuis, d'autres éléments ont été découverts aussi bien chez les bactéries Gram- et Gram+ que les mycoplasmes. Mais un faible nombre d'éléments est actuellement décrit. Il est très probable que ce nombre soit sous-estimé puisqu'il semble que ces éléments soient largement répandus au sein des bactéries. Au même titre que les plasmides et les prophages, ces éléments seraient un moyen de transfert de gènes. Après avoir donné leur définition et leur nomenclature, nous envisagerons le mode de fonctionnement de ces éléments et nous donnerons quelques données sur l'acquisition des modules et leurs conséquences.

#### **3.1-Définition :**

Ce sont des éléments qui sont normalement intégrés dans le chromosome des bactéries sauf pendant leur transfert où ils sont sous forme circulaire. Ces éléments combinent de nombreux caractères communs à ceux des plasmides et des phages. Comme les prophages ils sont capables de s'exciser et de s'intégrer dans le chromosome. Ils peuvent être transférés d'une bactérie à une autre par conjugaison de la même façon que les plasmides conjugatifs. Leur transfert contribue entre autres à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques [58].

#### **3.2-Nomenclature :**

A l'heure actuelle, la nomenclature est un véritable dilemme et les désignations de ces éléments ne sont pas du tout uniformes. Le premier élément étudié était Tn916. On l'a qualifié de transposon conjugatif car sa spécificité d'intégration était faible et qu'il pouvait être excisé et transposé dans la même cellule comme la plupart des transposons bactériens

mais il pouvait aussi être transféré entre des cellules par conjugaison. La nomenclature utilisée pour désigner ces éléments a pour inconvénient de ne pas permettre de savoir si les éléments appelés Tn suivi d'un numéro sont des transposons conjugatifs ou non conjugatifs. Le Tn916 et Tn5 ont la même nomenclature alors que le premier est un transposon conjugatif et le deuxième non. Ainsi, il a été proposé pour les différencier de rajouter le préfixe C pour conjugatif [58].

Ensuite, d'autres éléments ont été découverts et étudiés ce qui a permis de mieux comprendre leurs propriétés. Mais, plus ces connaissances étaient précises plus il était difficile de regrouper ces éléments sous un même terme. Ces études ont permis de mettre en évidence que ces éléments avaient des caractéristiques diverses incluant 1) le contact entre cellule grâce à des pili ou l'agrégation cellulaire, 2) le transfert d'un simple ou double brin d'ADN, 3) une spécificité d'intégration faible ou forte et 4) des recombinases caractérisées par la présence de sérines ou de tyrosines. Ceci a conduit à une nomenclature hétérogène incluant les transposons conjugatifs, les plasmides intégratifs et les îlots génomiques. En comparant les propriétés de plusieurs éléments Hochhut et Waldor en 1999 ont groupé le Tn5252 de *Streptococcus pneumoniae*, le Tn5276 de *Lactococcus lactis*, CTnscr94 de *Salmonella enterica* Senftenberg, les transposons conjugatifs de *Bacteroides*, les îlots de symbiose de *Mesorhizobium loti*, *clc* de *Pseudomonas* sp. B13 et SXT de *Vibrio cholerae* dans la classe des CONSTIN pour conjugal self transmissible integrating elements. Cependant, Tn916 n'était pas inclus dans cette classe à cause de sa faible spécificité d'intégration ainsi que l'élément pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens*, considéré comme un plasmide. Il en était de même pour les éléments R391 de *Providencia rettgeri* et R997 de *Proteus mirabilis* classés comme appartenant à la famille des plasmides IncJ. Mais ces deux derniers éléments ont été reclassés parmi les CONSTIN car ils présentaient des caractéristiques communes avec l'élément SXT de *V.cholerae* [8]. Récemment, le terme d'îlots génomiques a été proposé comme extension des îlots de pathogénicité. Selon les fonctions codées par ces îlots, on parle d'îlots de symbiose, d'îlots de pathogénicité, d'îlots métaboliques ou d'îlots de résistance. Cependant cette classe regroupe des éléments dont les structures sont très différentes. Les modes d'acquisition et les mécanismes de mobilité sont très différents et restent encore à élucider. Ainsi, il a été proposé d'établir une classe d'éléments contenant tous les éléments capables de s'exciser par des recombinaisons sites spécifiques en une forme intermédiaire circulaire, auto-transmissible par conjugaison et capable de s'intégrer dans le génome de l'hôte quelque soit le mécanisme d'intégration et de conjugaison [58]. Ces éléments seraient aussi capables de se répliquer pendant la conjugaison mais cette réplication ne devrait pas être impliquée dans leur maintien. Burrus et al (2002) ont

donc proposé de les appeler ICE pour integrative and conjugative elements. Les transposons conjugatifs capables d'être transposés dans une même cellule seraient un sous groupe de la classe des ICE. L'acronyme ICE peut aussi être utilisé pour nommer les nouveaux éléments découverts. Dans ce cas, ICE devrait être suivi par les initiales du genre et de l'espèce de la bactérie dans laquelle il a été isolé et un chiffre identifiant la souche ou le rang de découverte comme par exemple ICE $St1$  pour l'ICE de *Streptococcus thermophilus* [12].

### **3.3- Diversité des ICE :**

Les ICE ont été découverts chez les bactéries Gram+, Gram– et les mycoplasmes. Ci-dessous un tableau récapitulant l'ensemble des ICE connus indiquant le genre et l'espèce où on les a découverts, leurs fonctions, leurs tailles, les particularités de leurs intégrases et leurs sites d'insertion.

| Élément             | Genre ou espèces                       | Taille en kb | Fonctions caractérisées <sup>a</sup>  | Intégrase | Sites d'intégration dans l'hôte d'origine                    |
|---------------------|--|--------------|---------------------------------------|-----------|--|
| Tc <sup>c</sup> ERL | <i>Bacteroides fragilis</i>            | 80           | Tc                                    | ND        | Plusieurs sites  |
| CTnDOT              | <i>Bacteroides</i>                     | 65           | Tc, Em                                | Tyr       | Plusieurs sites  |
| CTnGERM1            | <i>Bacteroides ovatus</i> DH3716       | 75           | Em                                    | ND        | Plusieurs sites  |
| Ilot de symbiose    | <i>Mesorhizobium loti</i> R7A          | 502          | Système de sécrétion type IV          | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Phe</sup>    |
| Ilot de symbiose    | <i>Mezorhizobium loti</i> MAFF303099   | 611          | Système de sécrétion type IV          | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Phe</sup>    |
| Tn4371              | <i>Ralstonia</i> sp. A5                | 55           | Dégradation du biphenyl               | Tyr       | Plusieurs sites  |
| SXT                 | <i>Vibrio cholerae</i>                 | 99,5         | Su, Tm, Cm, Sm                        | Tyr       | Terminaison 5' du gène <i>prfC</i>                           |
| PJY1                | <i>Vibrio cholerae</i>                 | ND           | Su, Cm, Sm                            | ND        | ND   |
| R391                | <i>Providencia rettgeri</i>            | 89           | Kn, Hg                                | Tyr       | Terminaison 5' du gène <i>prfC</i>                           |
| R991                | <i>Proteus mirabilis</i>               | 85           | Ap, Sm, Su                            | Tyr       | Terminaison 5' du gène <i>prfC</i>                           |
| pMERPH              | <i>Shewallena putrefaciens</i>         | ND           | Hg                                    | Tyr       | Terminaison 5' du gène <i>prfC</i>                           |
| <i>Clc</i>          | <i>Pseudomonas</i> sp. B13             | 105          | Dégradation du chlorocatéchol         | Tyr       | Terminaison 3' de 2 gènes codant pour un ARNt <sup>Gly</sup> |
| <i>Bph-saI</i>      | <i>Pseudomonas putida</i>              | 90           | Dégradation du biphenyl et salicylate | ND        | ND   |
| cTnscr94            | <i>Salmonella enterica</i> Senftenberg | 100          | Utilisation du sucrose                | ND        | Terminaison 3' de 2 gènes codant pour un ARNt <sup>Phe</sup> |
| LpPI-1              | <i>Legionella pneumophila</i>          | 65           | Facteurs de virulence                 | Tyr       | Près d'un gène codant pour un ARNt <sup>Phe</sup>            |
| SPI-7               | <i>Salmonella enterica</i> Typhi       | 134          | Antigène Vi                           | Tyr       | Terminaison 3' de 2 gènes codant pour un ARNt <sup>Phe</sup> |
| P1056               | <i>Haemophilus influenzae</i>          | ND           | Tc, Ap                                | ND        | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Leu</sup>    |
| pSMA2               | <i>Streptomyces ambofaciens</i>        | 10,9         | ND                                    | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Pro</sup>    |
| pSA1                | <i>Streptomyces cyaneus</i>            | 9,1          | ND                                    | Tyr       | ND   |
| pIJ408              | <i>Streptomyces glaucescens</i>        | 15           | ND                                    | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Thr</sup>    |
| pIJ110              | <i>Streptomyces parvulus</i>           | 13,6         | ND                                    | ND        | ND   |
| SLP1                | <i>Streptomyces coelicolor</i>         | 17,2         | ND                                    | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Tyr</sup>    |
| Pmea100             | <i>Amycolatopsis mediterranei</i>      | 23,7         | ND                                    | ND        | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Phe</sup>    |
| Pmea300             | <i>Amycolatopsis methanolica</i>       | 13,3         | Mutateur, stimule la transformation   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Ile</sup>    |
| Pse211              | <i>Saccharopolyspora erythraea</i>     | 18,1         | ND                                    | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARNt <sup>Phe</sup>    |
| TnI549              | <i>Enterococcus</i> sp                 | 34           | Vm                                    | Tyr       | Région riche en base A+T                                     |
| Tn916               | <i>Enterococcus faecalis</i>           | 18,5         | Tc                                    | Tyr       | Région riche en base A+T                                     |
| Tn5397              | <i>Clostridium difficile</i>           | 21           | Tc                                    | Ser       | Un seul site   |
| Tn5252              | <i>Streptococcus pneumoniae</i>        | 47           | Cm, UV                                | Tyr       | Plusieurs sites intergéniques                                |

Suite tableau 4

| Élément              | Genre ou espèces                  | Taille en kb | Fonctions caractérisées <sup>a</sup>       | Intégrase | Sites d'intégration dans l'hôte d'origine                |
|----------------------|-----------------------------------|--------------|--|-----------|--|
| Tn5276               | <i>Lactococcus lactis</i>         | 70           | Utilisation du sucrose, synthèse de nisine | Tyr       | Plusieurs sites  |
| pRS01/sex factor     | <i>Lactococcus lactis</i>         | 48,4         | Résistance au tellurium                    | ND        | Un seul site   |
| CdiA1                | <i>Clostridium difficile</i>      | 30,6         | ND   | Tyr       | ND   |
| CdiA2                | <i>Clostridium difficile</i>      | ND           | ND   | Ser       | ND   |
| CdiB3                | <i>Clostridium difficile</i>      | 28,2         | ND   | Tyr       | ND   |
| CdiB4                | <i>Clostridium difficile</i>      | ND           | ND   | Ser       | ND   |
| EfaC1                | <i>Enterococcus faecalis</i>      | 25,3         | ND   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARN <sup>Thr</sup> |
| EfaC2                | <i>Enterococcus faecalis</i>      | 32,7         | ND   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour une GMP synthétase    |
| EfaD2                | <i>Enterococcus faecalis</i>      | ND           | ND   | Tyr       | ND   |
| SmuE                 | <i>Streptococcus mutans</i>       | 20,5         | ND   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARN <sup>Leu</sup> |
| Tn5801               | <i>Staphylococcus aureus</i>      | 25,8         | Tc   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour une GMP synthétase    |
| CW459 <i>Tet</i> (M) | <i>Clostridium perfringens</i>    | ND           | Tc   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour une GMP synthétase    |
| ICE $Lm1$            | <i>Listeria monocytogenes</i>     | 21,3         | Résistance au Cd <sup>2+</sup>             | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour une GMP synthétase    |
| ICE $St1$            | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 34,7         | Système de restriction type II             | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour une aldolase          |
| ICE $Bs1$            | <i>Bacillus subtilis</i> 168      | 20,5         | ND   | Tyr       | Terminaison 3' du gène codant pour un ARN <sup>Leu</sup> |
| ICEF                 | <i>Mycoplasma fermentans</i> PG18 | 23           | ND   | ND        | Nombreux sites   |

**Tableau 4** : Récapitulatifs des ICE connus [15].

Ap : ampicilline ; Cm : Chloramphénicol ; Em : érythromycine ; Hg : mercure ; Kn : kanamycine ; ND : non déterminé ; Ser : sérine recombinase ; Tyr : tyrosine recombinase ; Sm : streptomycine ; Su : sulfaméthoxazole ; Tc : tétracycline ; Tm : triméthoprime ; Tyr : tyrosine recombinase ; Vm ; vancomycine.

<sup>a</sup> Les fonctions codées par ces ICE sont celles qui ne sont pas impliquées dans les phénomènes d'excision et d'intégration, le transfert d'ADN ou la régulation de leur mobilité.

### 3.4- Mode de fonctionnement des ICE :

#### 3.4.1- Etapes générales du transfert :

Les étapes générales du transfert des ICE ont été en partie bien établies pour le transposon conjugatif Tn916 d'*E.faecalis* et les transposons conjugatifs des bactéries appartenant au genre *Bacteroides*. Des homologies de séquences d'ADN existent entre les transposons conjugatifs et le plasmide RK2 d'*E.coli* ce qui suggère que les mécanismes de transfert sont comparables après l'excision et la circularisation du transposon conjugatif. Nous nous appuyerons sur ces données pour illustrer le mécanisme de transfert de ces éléments. Ainsi les étapes générales suivantes peuvent être proposées :

- 1) excision du transposon conjugatif après clivage du double brin d'ADN.
- 2) circularisation du transposon conjugatif excisé.
- 3) interaction entre la cellule receveuse et la cellule donneuse et formation du pore d'accouplement.
- 4) formation du relaxosome et incision d'un simple brin au niveau de l'*oriT* de l'intermédiaire circulaire.
- 5) transfert du brin coupé par le pore d'accouplement à la cellule receveuse.
- 6) ligation et recircularisation de ce simple brin.
- 7) synthèse du brin complémentaire.
- 8) ciblage de la séquence d'insertion du transposon conjugatif dans la cellule receveuse et clivage de l'ADN cible où le transposon conjugatif s'intégrera.
- 9) intégration du transposon conjugatif dans la séquence cible.

Toutes ces étapes vont être maintenant détaillées :

1) Au cours de l'excision, un clivage au niveau des terminaisons du Tn916 crée de chaque côté un simple brin de 6 pnb appelé séquence terminale. Les terminaisons du Tn916 sont riches en bases A+T et le transposon s'insère dans une région riche en bases A+T, il a été difficile de déterminer pour ces raisons la longueur des séquences terminales. Dans un cas, il était possible de distinguer 5 pnb et dans un autre 7 pnb, donc on a considéré que la séquence

terminale avait une longueur de 6 pdb [56]. Ces séquences terminales ne sont pas complémentaires et lorsqu'elles se rejoignent pour former la forme circulaire intermédiaire on a des mésappariements [58]. Les gènes impliqués dans l'excision et l'intégration de Tn916 ont été identifiés. Il s'agit des gènes *int* et *xis* qui participent aussi à l'excision et l'intégration de l'élément CTnDOT des bactéries du genre *Bacteroides* [20]. Ces deux gènes se trouvent à une des extrémités du transposon conjugatif en aval du gène *tetM* codant pour la résistance à la tétracycline. Le produit du gène *int* est essentiel pour l'excision et l'intégration, alors que le gène *xis* stimule l'excision mais n'est pas essentiel pour l'intégration. L'intégrase Int possède un site de fixation à l'ADN qui inclue les séquences terminales. Il semblerait que certaines séquences terminales se lient mieux que d'autres à l'intégrase ce qui pourrait expliquer pourquoi certaines séquences terminales permettent la transposition plus facilement que d'autres.

2) La protéine Int aurait deux domaines de fixation, un à l'extrémité N-terminale et l'autre à l'extrémité C-terminale. Dans un premier temps, un domaine de fixation se lie à une des extrémités du Tn916 au niveau d'une séquence inversée répétée imparfaite dans un environnement riche en bases A+T. Puis l'autre domaine entre en contact avec l'autre extrémité du Tn916. Les deux extrémités se rapprochent pour former une boucle conduisant à son excision et sa circularisation [72]. La protéine Xis protège les séquences d'ADN en s'enveloppant autour comme des histones pour faciliter son alignement avec la protéine Int. De plus, Xis stimule l'activité de Int et peut favoriser l'excision plutôt que l'intégration en inhibant la fixation de Int sur un site plus distal impliqué dans l'intégration. Il est probable que des facteurs de l'hôte soient impliqués dans la transposition, comme le confirme le fait que *Lactococcus lactis* peut recevoir et intégrer Tn916. Mais cette bactérie ne peut pas jouer le rôle de donneuse pour ce transposon conjugatif. Une fois l'élément intégré dans cet organisme, il ne peut plus s'exciser [19]. Les facteurs de l'hôte intervenant dans la transposition de ces éléments n'ont pas encore été identifiés mais ces facteurs semblent être conservés d'une bactérie à l'autre puisque le Tn916 possède un spectre d'hôte large.

3) Les étapes du transfert conjugatif ont été en partie décrites pour les plasmides. On suppose que ces étapes sont identiques à celles permettant le transfert conjugatif des ICE, une fois qu'ils sont circularisés. Lors de ce transfert la cellule donneuse et receveuse entre en contact. Ce contact entre cellules est facilité par la présence de pili codés par les gènes de transfert portés par le plasmide de la cellule donneuse. Un signal de transfert, probablement produit suite à ce contact, conduit à la formation du pore et au transfert d'un simple brin d'ADN lié à des protéines. Ce pore probablement stabilisé par les pili est un complexe multi-protéique qui traverse la membrane cytoplasmique interne chez les bactéries Gram+, la

membrane interne et externe chez les bactéries Gram- et relie la cellule donneuse à la receveuse. Aucun des ORF de la région de transfert de Tn916 n'a de similarité avec des gènes codant pour des pili sexuels de plasmides. De plus, le nombre de gènes possibles dans cette région est faible comparé à celle des plasmides. Cependant, le plasmide d'*E.faecalis*, dont le mécanisme de transfert est sous la dépendance de phéromones peptidiques, utilise un récepteur protéique présent dans la membrane de la cellule donneuse et non des pili sexuels pour initier le contact entre cellules et conduire à la formation d'un pore. Il est donc possible que Tn916 utilise le même genre de système de transfert.

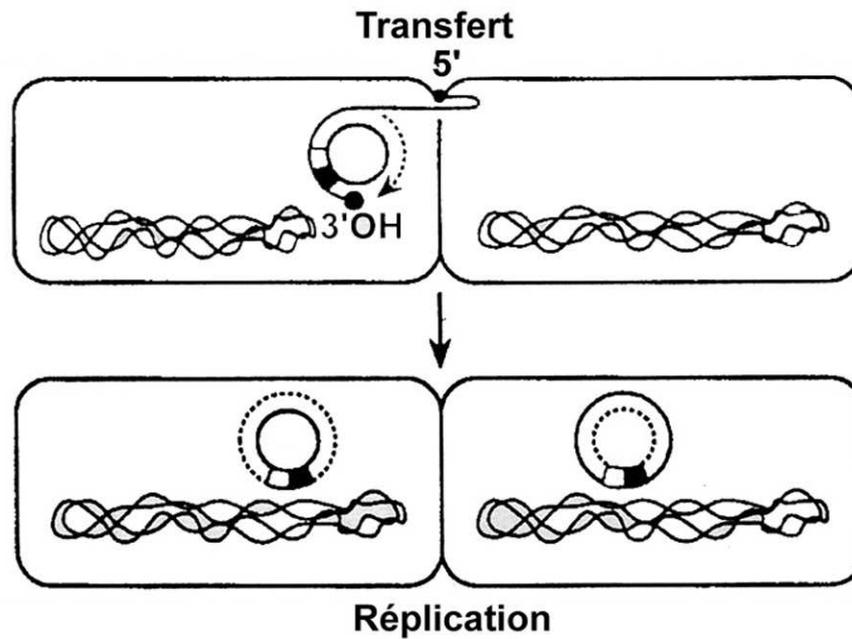
4) Le relaxosome situé à la base du pore est un complexe constitué d'ADN et de protéines crée par la liaison de certaines protéines de transfert à une région de l'ADN plasmidique appelée *oriT* (origine de transfert). Le transfert commence par une coupure dans un simple brin d'ADN au niveau d'un site appelé *nic* à l'intérieur de l'*oriT* par une enzyme faisant partie du relaxosome : une relaxase. Ces relaxases semblent être largement distribuées parmi les différents plasmides, transposons conjugatifs et éléments mobilisables des bactéries Gram+ et Gram-. Toutes ces relaxases ont en commun une extrémité N-terminale possédant une activité catalytique et une extrémité C-terminale qui serait impliquée dans l'interaction avec d'autres composés intervenant dans le transfert [27]. Pour le plasmide RK2, les protéines essentielles à la formation du relaxosome sont TraI, TraJ et TraK. Le site de coupure est localisé au milieu de la séquence *oriT* qui a une taille minimale de 250 pdb pour le plasmide RK2. La région où se trouve le site de coupure est une courte séquence de 8 pdb près de laquelle se trouve une séquence inversée répétée de 40 pdb. TraI, qui est une relaxase, reconnaît cette courte séquence et coupe un simple brin d'ADN au niveau du site de coupure. TraK se lie à une région proche du site de coupure pour envelopper l'ADN est formé une structure comparable à celle d'un nucléosome. TraJ reconnaît une partie de la séquence proche du site de coupure et interagit avec TraI. La taille minimale des *oriT* n'est pas précisément définie mais une *oriT* typique a une taille de 100 pdb et les sites de coupure une taille d'environ 10 pdb. Peu de choses sont connues en ce qui concerne le transfert de la plupart des transposons conjugatifs mais on suppose que leur transfert est identique à celui des plasmides conjugatifs. La présence d'une origine de transfert n'a été mise en évidence que pour les transposons conjugatifs CTnDOT des bactéries du genre *Bacteroides*, Tn5252 de *Streptococcus pneumoniae* et l'élément SXT de *V.cholerae*. La localisation de l'*oriT* est discutée pour Tn916. L'intégration de Tn916 dans un plasmide ne permet pas sa mobilisation en cis. Mais, Tn916 est capable de s'exciser du plasmide et d'être transféré dans une cellule receveuse. Une explication possible de cet échec est que l'*oriT* de Tn916 serait proche d'une des extrémités de cet élément et que la formation d'une forme circulaire serait nécessaire pour

générer une région *oriT* active. Des études ont montré que cette *oriT* était peut être plutôt localisée dans une région plus interne et aurait une homologie avec une protéine de mobilisation MbeA. Il a été supposé que le transfert conjugatif augmenterait le nombre de formes excisées, masquant le transfert de Tn916 cointégré dans le plasmide. Une des solutions pour prouver la présence d'une *oriT* serait d'insérer dans un plasmide non-mobilisable un Tn916 sans les gènes *xis* et *int*. Si une *oriT* existe, le plasmide devrait être transféré sous forme d'une unité intacte. Par contre, les transposons conjugatifs des bactéries du genre *Bacteroides* sont capables de transférer des plasmides non mobilisables en cis. L'*oriT* de CTnDOT a été clonée et identifiée. Elle est située vers le milieu de cet élément mais elle ne présente aucune des caractéristiques des régions *oriT* connues. Bien que les régions *oriT* soient habituellement situées près de gènes codant pour des protéines de mobilisation qui se lient à cette *oriT* pour former le relaxosome, les gènes codant pour les protéines de mobilisation de CTnDOT sont situées à 3 kb de la région *oriT*. Il semble que les gènes proches de cette *oriT* codent pour des protéines de régulation contrôlant l'expression des gènes de mobilisation.

5) Lors du transfert de plasmides conjugatifs, TraI, TraJ et TraK liées à l'extrémité 5' de l'ADN vont conduire le simple brin coupé dans la cellule receveuse grâce à leur interaction avec des molécules de mobilisation encore appelées protéines de couplage. Les gènes impliqués dans la production des molécules de mobilisation sont au nombre de 12 pour le plasmide RK2 [72]. Ces produits de gènes seraient associés avec la membrane bactérienne. Deux d'entre eux TraF et TraG sont absolument nécessaires pour la conjugaison. TraG possède un domaine de liaison aux NTP et pourrait fournir l'énergie nécessaire au transport de l'ADN jusqu'au pore de conjugaison. Ce gène TraG est très conservé au sein des plasmides conjugatifs. TraF est associé avec TraG et ils interagiraient avec le relaxosome pour commencer le transfert du simple brin d'ADN coupé [72]. Le pore de conjugaison est en fait un système de transfert appartenant à un sous-groupe des systèmes de sécrétion de type IV utilisant de l'énergie pour le transport de l'ADN et de protéines de la cellule donneuse à la cellule receveuse [59]. On pense que le système de sécrétion de type IV est responsable du transport de la relaxase jusque dans la cellule receveuse. En résumé de tout ce qui vient d'être dit, l'ADN lié de manière covalente à la relaxase est dans un premier temps transporté de manière passive, traîné par la relaxase. Les pili joueraient le rôle d'aiguille permettant de pousser l'ADN dans la cellule receveuse. Puis, l'ADN serait pompé dans la cellule receveuse, utilisant le conduit formé par le système de sécrétion de type IV. Cette seconde étape serait catalysée par des protéines de couplage telles que TrwB du plasmide R388, TraD des plasmides IncF, TraG des plasmides IncP et VirD4 du plasmide Ti d'*Agrobacterium*

*tumefaciens* [39]. L'ORF20 du transposon conjugatif Tn1549 d'*Enterococcus* subspecies présente une forte similarité avec TrsE, l'homologue de la protéine VirB4 codée par le plasmide pG01 (27 % d'identité sur 437 acides aminés pour un total de 800 acides aminés). VirB4 est une famille d'ATPases qui semble intervenir dans la transduction d'information, certainement en induisant des changements de conformation ATP dépendantes des sous-unités constituant le pore de conjugaison [27]. L'ORF16 de Tn916 présente 43 % de similarité avec l'ORF50 du plasmide pAD1 d'*E.faecalis* une protéine homologue à la protéine VirB1. Cette protéine VirB1 présente de forte similarité avec la famille des transglycosylases. On pense que ces molécules aideraient l'ADN et/ou des protéines à traverser la membrane cellulaire en ouvrant localement les peptidoglycanes [27].

6, 7) Dans la cellule donneuse, la réplication unidirectionnelle de la forme circulaire par extension de l'extrémité 3'OH générée par le clivage de l'*oriT* par TraI est réalisée par les enzymes de réplication de la cellule donneuse (hélicase, polymérase III) en même temps que l'extrémité 5' reliée à la relaxase est transférée par le pore de conjugaison à la cellule receveuse (Figure 4). Un second clivage de la molécule d'ADN a lieu au niveau de l'extrémité 3'OH du simple brin transféré dans la cellule receveuse. TraI catalyse ce second clivage et la réaction de ligation permettant d'obtenir une forme circulaire simple brin. Puis on a réplication de ce simple brin par les enzymes de réplication de la cellule receveuse. Après transfert de ce simple brin et sa réplication, la cellule donneuse et receveuse contiennent chacune une copie de la forme circulaire double brin.



**Figure 4 :** Représentation de l'étape de transfert et de la réplication de la forme circulaire intermédiaire d'un transposon conjugatif d'après Salyers et al 1995 [58].

8, 9) L'intégrase catalyse la réaction permettant l'intégration de cet élément dans le chromosome de la cellule receveuse. Pour *Tn916*, cette forme circulaire double brin s'intègre au niveau de la séquence cible de la cellule receveuse où des mésappariements existent entre les séquences terminales et le site cible. Ces mésappariements sont corrigés lors de la réplication de l'ADN [58]. Il a été démontré expérimentalement que plus de la moitié des transconjugants résultant du transfert intercellulaire de *Tn916* portent le plus souvent plus d'une copie de ce transposon [21]. Pour l'élément SXT, l'intégration de l'intermédiaire circulaire a lieu via une recombinaison site spécifique entre une séquence de 17 pnb de l'intermédiaire circulaire et une séquence similaire de 17 pnb dans le gène *prfC* [32]. Pour que le transfert puisse avoir lieu, il faut que le gène *int* de l'élément SXT soit exprimé à la fois chez la cellule donneuse et la cellule receveuse, contrairement au *Tn916* pour lequel l'intégrase semble être transférée avec l'ADN pendant la conjugaison [32, 14]. Pour l'élément CTnDOT des bactéries du genre *Bacteroides*, une région de proche identité entre une des terminaisons du transposon conjugatif et le site cible d'insertion est responsable de la spécificité de sélection du site cible. Mais l'insertion n'a pas lieu dans cette région mais 4 pnb en amont. Le mécanisme d'intégration est donc à priori différent de celui de *Tn916*.

Pour les transposons conjugatifs, un transfert intracellulaire existe. Dans ce cas, on a excision et formation d'un intermédiaire circulaire fermé. La forme circulaire excisée ne se

réplique pas. Elle peut s'intégrer soit dans le génome de la même cellule (ex : Tn916), soit dans un plasmide résident (ex : *Bacteroides*).

### **3.4.2- Caractéristiques des intégrases impliquées dans l'excision et l'intégration des ICE :**

Deux familles de recombinaisons sites spécifiques sont connues, la famille des recombinaisons caractérisées par la présence de sérines et la famille des recombinaisons caractérisées par la présence de tyrosines. Les recombinaisons caractérisées par la présence de sérines sont impliquées dans l'insertion ou l'excision de certains prophages et des éléments Tn5397, CdiA2 et CdiB4 retrouvés chez *Clostridium difficile* alors que les recombinaisons caractérisées par la présence de tyrosines sont impliquées dans l'intégration et l'excision d'un très grand nombre d'éléments intégratifs incluant la plupart des prophages tels que ceux de la famille  $\lambda$ . La plupart des intégrases appartenant à la famille des recombinaisons caractérisées par la présence de tyrosines catalysent généralement l'intégration site spécifique dans l'extrémité 3' de gène codant pour des ARNt [12].

### **3.4.3- La spécificité des sites d'insertion :**

La plupart de ces éléments sont insérés dans des sites spécifiques sauf pour 9 éléments qui s'insèrent dans de nombreux sites. Il s'agit de l'ICEF de *M.fermentans* souche PG18, de Tc<sup>E</sup>ERL de *Bacteroides fragilis*, de CTnDOT des bactéries du genre *Bacteroides*, de CTnGERM1 de *Bacteroides ovatus* DH3716, de Tn4371 de *Ralstonia* sp. A5, de Tn1549 de *Enterococcus* sp, de Tn916 d'*E.faecalis*, de Tn5252 de *Streptococcus pneumoniae* et de Tn5276 de *L.lactis* [15]. Les membres de la famille Tn916-Tn1545 ont été trouvés naturellement ou ont été introduits dans plus de 50 espèces bactériennes différentes et plus de 20 genres bactériens différents.

L'étude des prophages  $\lambda$  et d'autres ICE révèlent l'existence de sites d'intégrations secondaires. De plus, certains transposons conjugatifs et ICE ont une forte spécificité d'intégration pour certains hôtes et une plus faible pour d'autres. L'élément pSE101 est intégré dans l'extrémité 3' du gène codant pour un ARNt<sup>Thr</sup> de *Saccharopolyspora erythrae* mais on le retrouve dans de nombreux sites chez *Streptomyces lividans*. De la même façon, le Tn916 qui s'intègre dans un grand nombre de sites chez *E.faecalis* s'intègre préférentiellement dans un unique site, att916, chez *Clostridium difficile*. Le Tn5397 de *C.difficile* est intégré en un unique site mais il est présent chez *Bacillus subtilis* dans un

nombre important de sites [12]. Pour l'élément SXT de *V.cholerae* 9 sites secondaires d'intégration ont été détectés et l'un d'entre eux, la terminaison 5' du gène *pntB* est une cible fréquente lorsque le site d'intégration dans la terminaison 5' du gène *prfC* est absent. Lorsque SXT est intégré dans le gène *pntB* il est encore transmissible mais avec une fréquence 10 fois moins importante. L'existence de sites alternatifs pour des éléments qui semblent intégrer des sites spécifiques permet d'élargir leur spectre d'hôte [14].

#### **3.4.4- Différences et points communs entre les ICE et les autres éléments génétiques mobiles :**

Le mécanisme d'intégration et d'excision diffère de celui des IS puisque la transposition des IS peut être répliquative ou non répliquative. Un transposon possède des séquences terminales inversées répétées et des séquences directes répétées résultant de la duplication du site cible lors de son intégration, ce ne sont pas des caractéristiques systématiques d'ICE. Mais comme les séquences d'insertion, les ICE sont intégrés dans le chromosome de l'hôte.

Les plasmides et les ICE participent à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques parmi les bactéries Gram- et Gram+. Comme les plasmides conjugatifs, un simple brin est probablement transféré par conjugaison sauf pour pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens* et d'autres ICE appartenant à des actinobactéries où un double brin d'ADN est transféré entre la cellule donneuse et la cellule receveuse [27]. Cependant, alors que la répllication du simple brin a certainement lieu pendant le transfert des éléments possédant une *oriT*, le maintien des différents transposons conjugatifs dans les bactéries receveuses et donneuses n'implique pas seulement la répllication de la forme circulaire simple brin transférée mais aussi son intégration dans le chromosome. Les transposons conjugatifs sont des éléments très sociables car contrairement aux plasmides des groupes d'incompatibilité et à certains transposons standards, une souche peut cumuler plusieurs transposons [30]. La seule limite se rencontre lorsque des transposons conjugatifs ont le même site d'insertion. La présence dans une même cellule des deux éléments très proches SXT de *V.cholerae* et R391 de *Providencia rettgeri* ne diminue pas significativement la possibilité d'acquérir d'autres éléments, indiquant que ces deux éléments ne codent pas pour des déterminants d'exclusion de surface [30]. Pour Tn916, la présence de deux copies stimule la transposition des copies présentes dans la même cellule grâce à l'activation en trans de l'expression des gènes *xis* et *int* par un phénomène inconnu. On parle de phénomène de transactivation [19]. Chez les bactéries du genre *Bacteroides* la surexpression d'un gène de régulation *rteC* est responsable

d'une augmentation du transfert des transposons conjugatifs lorsque ces derniers sont présents en multiples copies [20].

Les transposons conjugatifs ont des intégrases qui présentent de fortes homologies avec celles des bactériophages de la famille  $\lambda$ . Il a été démontré qu'au niveau de la séquence en acides aminés leurs intégrases appartiennent aux mêmes familles. Elles ont une séquence identique au niveau de leur site actif mais elles diffèrent en dehors de cette région. Le mécanisme d'excision et d'intégration des ICE ressemble à celui des phages mais ils ne donnent pas de particules virales et les modalités de transfert sont différentes [58]. Les rôles des protéines Xis et Int du phage  $\lambda$  et de Tn916 sont très proches mais une différence importante est que la séquence du phage a une homologie avec le site d'insertion de la bactérie hôte. Pour Tn916, le site cible de la bactérie hôte n'a pas d'homologie avec la séquence s'insérant mais il semble qu'il ait une préférence pour les séquences d'ADN de l'hôte intrinsèquement liées. Par contre, pour l'élément SXT de *V.cholerae* qui a une insertion site spécifique la séquence cible et la séquence de l'intermédiaire circulaire présentent des homologies.

### **3.4.5- Régulation du transfert de gènes : rôle des antibiotiques :**

L'exposition de bactéries donneuses du genre *Bacteroides* portant le transposon conjugatif CTnDOT à de faibles concentrations de tétracycline multiplie par 10 000 l'auto-transfert de ce transposon [20]. Pour stimuler le transfert, une exposition courte (< 30 min) et avec de faibles concentrations de tétracycline (1  $\mu\text{g/ml}$ ) suffisent. La plupart des gènes responsables de la stimulation par la tétracycline ont été identifiés et caractérisés. La tétracycline multiplie par 20 la transcription d'un opéron contenant le gène *tetQ* et de deux gènes de régulation appelés *rteA* et *rteB*. Le mécanisme par lequel la transcription de l'opéron *tetQ-rteA-rteB* est stimulée n'est pas connu mais il est clair que les protéines RteA et RteB ne sont pas nécessaires pour l'expression de cet opéron. Il est possible que certaines protéines de l'hôte puissent interagir avec la tétracycline pour stimuler la transcription. L'augmentation de la transcription résulte de l'augmentation de la production des protéines RteA et RteB. RteB est essentiel pour le transfert ce qui n'est pas le cas de RteA. Un des rôles de RteB est d'activer l'expression du gène *rteC* situé en aval. Le mécanisme par lequel RteB active le gène *rteC* n'est pas connu. RteB joue aussi le rôle d'un antirépresseur. Il contre l'effet répresseur qui empêche l'expression des gènes de transfert. Ce répresseur n'a été ni identifié ni cloné mais son existence est prouvée. Lorsque la région de transfert de Tc<sup>r</sup>Em<sup>r</sup> DOT (= CTnDOT) est clonée à part des gènes *rteA*, *rteB* et *rteC* et du reste de ce transposon, elle est

capable d'auto-transfert. Le mode d'action de la protéine RteC n'est pas très clair. Une interruption dans le gène *rteC* abolit complètement le transfert du transposon mais elle a peut d'effet sur la mobilisation d'un plasmide corésident. Ainsi, RteC semblerait contrôler l'expression des gènes essentiels pour l'excision et la circularisation du transposon. RteC et RteB sont deux antirépresseurs mais on ne sait pas s'ils agissent sur des répresseurs identiques ou différents. Le transfert de Tn916 est aussi stimulé par la tétracycline. Certains rapportent que la présence de la tétracycline multiplie par 10, d'autres par 100 le transfert de Tn916. La tétracycline stimulerait l'expression des gènes *int* et *xis*. Ces gènes sont localisés en aval du gène *tetM*, et sont transcrits dans la même direction ainsi la tétracycline en stimulant la transcription du gène *tetM* augmenterait du même coup celle des gènes *xis* et *int*. Des études ont mis en évidence que des gènes de régulation pouvaient exister. Un de ces gènes a été désigné *traA* et il serait situé en amont des gènes *xis* et *int* et en aval du gène *tetM*. Le mode d'action de TraA est inconnu mais semble différent de celui de *Bacteroides* [19].

### **3.5- Particularités des ICE :**

#### **3.5.1- Un élément original : SXT de *V.cholerae* :**

*V.cholerae* est une bactérie Gram- qui cause une maladie diarrhéique sévère : le choléra. Cette bactérie possède un ICE appelé SXT de 62 kb qui porte les gènes de résistance au sulfaméthoxazole, au triméthoprim, au chloramphénicol et à la streptomycine. Cet élément a été initialement détecté dans le sérotype émergent O139 de *V.cholerae*, mais des éléments très proches ont été retrouvés dans tous les isolats cliniques du continent indien. SXT a aussi été récemment détecté dans des isolats de *Providencia alcalifaciens* de patients diarrhéiques au Bangladesh. SXT semble être représentatif d'une famille d'ICE dans laquelle on retrouve l'élément R391 de *Providencia rettgeri* initialement décrit en 1972 dans des isolats d'Afrique du Sud et qui porte des gènes de résistance à la kanamycine et au mercure intégré dans le même site que SXT c'est-à-dire l'extrémité 5' du gène *prfC*. L'élément SXT s'intègre de manière site spécifique aussi bien chez *V.cholerae* O139, *V.cholerae* EI Tor O1 que chez *E.coli* K-12. SXT intègre l'extrémité 5' du gène *prfC* codant pour RF3 (Release Factor 3). L'intégration de l'élément SXT interrompt le gène *prfC*, mais l'élément code pour une nouvelle terminaison 5' du gène *prfC* qui restaure le cadre de lecture de ce gène. L'allèle *prfC* recombinant créé par l'intégration de l'élément SXT est fonctionnel. L'élément SXT code non seulement pour un nouveau RF3 mais aussi fournit un promoteur et un site de liaison pour un ribosome nécessaire à l'expression du gène *prfC*. Puisque RF3 joue un rôle

dans la régulation de la traduction, le gène *prfC* devient une cible intéressante pour l'élément SXT car la protéine RF3 recombinante peut influencer la traduction des gènes de l'élément SXT [30]. Cependant, d'autres sites d'intégration ont été découverts chez des bactéries ne possédant pas de gènes *prfC* mais dans ce cas la fréquence de transfert était plus faible. Donc, RF3 ne semble pas absolument nécessaire au transfert de l'élément SXT mais son absence peut expliquer la diminution de fréquence de transfert [14].

SXT est le seul élément pour lequel on a prouvé qu'il possédait des gènes codant pour des pili sexuels proches de ceux de plasmides conjugatifs. En effet, SXT possède des gènes proches de ceux du plasmide F qui codent pour l'assemblage des pili et la formation du pore d'accouplement. De plus, récemment on a montré que les produits de gènes codés par l'élément SXT essentiels pour l'assemblage des pili et la préparation de l'ADN au transfert étaient similaires à des systèmes de conjugaison trouvés dans plusieurs autres bactéries Gram-incluant les plasmides R27 de *Salmonella enterica* sérovar Typhi, PNL1 de *Spingomonas aromaticivorans*, Rts1 d'*E.coli* et l'îlot génomique de *Neisseria gonorrhoeae*. L'excision, l'intégration et la régulation du transfert de l'élément SXT semblent être très proches de ce qui se passent pour le phage  $\lambda$ . L'analyse d'un élément de la même famille que SXT, l'élément R391 de *Providencia rettgeri* a montré que cet élément utilisait aussi un mécanisme d'intégration identique à celui des phages [8].

Plus de la moitié du génome de SXT n'est pas utile à la mobilisation de cet élément. Deux loci de SXT, désignés *setC* et *setD*, dont la séquence en acides aminés est similaire à celle des régulateurs flagellaires FlhC et FlhD, codent pour des régulateurs qui activent la transcription des gènes nécessaires à l'expression du gène *int* et donc à l'intégration de l'élément SXT [14]. FlhC et FlhD ont initialement été décrits comme des régulateurs flagellaires de la transcription des gènes d'*E.coli*, mais des études récentes ont révélé que ces gènes étaient impliqués dans la régulation de plusieurs procédés dont la division cellulaire (seulement FlhD), la forme des cellules, la production de facteurs de virulence et la respiration anaérobie. Chez *E.coli*, FlhC et FlhD forme un complexe hétérotétramérique qui se lie aux promoteurs de l'opéron flagellaire activant sa transcription. Il est nécessaire de réaliser d'autres études pour savoir si SetC et SetD s'oligomérisent et activent directement la transcription comme c'est le cas pour FlhC et FlhD. Un autre locus désigné *setR*, dont le produit partage une forte homologie avec un répresseur de phage  $\lambda$ , semble aussi intervenir dans la régulation de l'expression des gènes de l'élément SXT. SetR serait impliqué dans la régulation de l'expression des gènes *setC* et *setD*.

### 3.5.2- Les éléments NBU de *Bacteroides* : des ICE handicapés ? :

Le genre *Bacteroides* possède des éléments appelés NBU (Nonreplicating *Bacteroides* unit) [58], qui peuvent être excisés et mobilisés vers la cellule receveuse en trans par un transposon conjugatif également présent dans la cellule donneuse. Les NBU représentent une famille hétérogène d'éléments intégrés qui ont une taille comprise entre 10 et 12 kb. Ils ont en commun des séquences fortement similaires entre elles, comprenant un gène de mobilisation (*mob*) et une région *oriT*. Leur excision et circularisation sont sous le contrôle de RteB, produit par un transposon conjugatif en général situé dans une région distincte du chromosome. Les NBU codent pour une seule protéine de mobilisation qui semble capable de se lier à leur *oriT*, coupant ce site et initiant le transfert d'une copie simple brin du NBU par le pore fournit par le transposon conjugatif. La forme circulaire des NBU peut aussi être mobilisée par des plasmides conjugatifs tels que les plasmides RK2, R751 et le plasmide IncP. Ces NBU peuvent être transférés entre des bactéries du genre *Bacteroides* et *E.coli* et inversement. Le transfert entre des bactéries Gram+ et des bactéries du genre *Bacteroides* n'a pas encore été testé. Ces NBU peuvent être intégrés dans des plasmides. Ces plasmides sont alors mobilisables par des transposons conjugatifs [58]. Le mécanisme de transposition de ces éléments ressemble plus à celui des phages  $\lambda$  qu'à celui des transposons conjugatifs. L'étude de NBU1 a montré que la forme circulaire avait pour site d'intégration la terminaison 3' d'un gène codant pour une ARNt-leucine. La plupart des phages intègrent des sites proches des gènes codant pour des ARNt. Le gène codant pour l'intégrase de NBU1 a été identifié et séquencé. Cette intégrase est un membre de la famille des intégrases de phage  $\lambda$ . Les acides aminés et la présence de tyrosines à l'extrémité C-terminale sont identiques à ceux retrouvés chez les intégrases de la famille des phages  $\lambda$ . Mais le reste de la protéine est différent. Certains NBU comme NBU1 et NBU2 portent des gènes de résistance à la céfoxitine et participent à sa dissémination au sein des espèces du genre *Bacteroides*. Ces NBU ne sont pas les seuls éléments intégrés mobilisés par les transposons conjugatifs de *Bacteroides*. Tn4399 de *Bacteroides fragilis* a certaines caractéristiques communes aux transposons non conjugatifs comme la duplication du site cible lors de son intégration. Cependant, comme certains transposons conjugatifs, il possède une *oriT*, code pour deux protéines de mobilisation et emporte lors de son excision une séquence de 5 pnb. L'*oriT* est interne ce qui suggère que ce transposon possède un intermédiaire de transfert circulaire. Le transfert de Tn4399 d'une cellule donneuse à une cellule receveuse est multiplié par 1 000 en présence de tétracycline ou d'autres transposons conjugatifs de *Bacteroides* dans la même souche. Mais on ne sait pas comment les transposons conjugatifs de *Bacteroides* et la tétracycline agissent sur le transfert

de Tn4399. Tn4399 et les éléments NBU ont une séquence de 1 kb commune située en amont de la région *oriT*. Cette séquence a une forte similarité avec des primases et pourrait jouer un rôle dans la régénération de la forme circulaire double brin après le transfert du simple brin dans la cellule receveuse [58].

### **3.5.3- Les îlots de pathogénicité : des "gros porteurs" de fonctions biologiques complexes :**

Les mécanismes de transfert de gènes sont connus depuis longtemps pour les plasmides et les prophages, la découverte des îlots de pathogénicité est récente. La comparaison des génomes de différents organismes a permis d'identifier des structures génétiques similaires dans différentes bactéries pathogènes mais aussi dans des bactéries non pathogènes. Selon les fonctions codées par ces îlots génomiques, ces éléments peuvent aussi être appelés îlots de pathogénicité, îlots de résistance, îlots de symbiose ou îlots métaboliques. Malgré, des différences de contextes écologiques et de diversités phylogénétiques des organismes impliqués les îlots génomiques partagent des caractéristiques très conservées. Les îlots génomiques sont des éléments génétiques mobiles. Les îlots génomiques sont présents dans le chromosome d'un grand nombre de bactéries mais leur présence dans des chromosomes de bactéries appartenant à des souches proches n'est pas systématique. Ils sont de grande taille (10-200 kb), cependant des éléments de plus petite taille existent (1-10 kb) et sont appelés "îlots" génomiques. Ils diffèrent du reste du génome par leur teneur en bases G+C. Ils sont flanqués de séquences directes répétées qui semblent résulter de leur intégration dans le chromosome. Ils sont habituellement intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant pour un ARNt. Ils possèdent souvent des gènes codant pour leur mobilité tels que des gènes de phages, des séquences d'insertion, des intégrases, des transposases, et des origines de transfert. Les îlots génomiques codent pour plusieurs fonctions qui dépendent du contexte environnemental dans lequel vivent les bactéries.

Les îlots génomiques les mieux connus sont les îlots de pathogénicité qui possèdent un ensemble de gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence. Ces facteurs vont de la synthèse de facteurs d'adhésion (adhésines et fimbriae) aux mécanismes nécessaires pour la pénétration dans les cellules de l'hôte en passant par l'acquisition de systèmes permettant aux bactéries d'avoir accès à des métabolites limitants (système de captation du fer) ou leur permettant la production de toxines (hémolysine, entérotoxine...). Les îlots de pathogénicité codent pour des systèmes de sécrétion de type III et de type IV leur permettant l'excrétion de protéines interagissant directement sur les fonctions de la cellule hôte. L'îlot de symbiose de

*Mesorhizobium loti* possède des fonctions capables de rendre une souche saprophyte symbiotique. Cet îlot de symbiose est intégré dans le gène qui code pour un ARNt<sup>Phe</sup> et présente une intégrase de la famille des phages P4. Cet îlot de symbiose occupe 10 % du génome de *Mesorhizobium loti* et c'est un des plus grands îlots de pathogénicité connus. Les îlots génomiques possèdent aussi des gènes de résistance aux antibiotiques. L'îlot de pathogénicité SaPII de *S.aureus* possède une région appelée *mecA* dont l'expression est responsable de la résistance à la méthicilline. La région *mecA* a une taille de 30 à 50 kb et elle est présente chez les souches de staphylocoques résistantes à la méthicilline mais absentes des souches sensibles. La présence d'éléments génétiques mobiles tels que IS257 et de gènes codant pour une transposase dans la région *mecA* indique que ce gène a été acquis par des transferts de gènes horizontaux [29]. La souche uropathogène d'*E.coli* 536 (O6 : K15 : H31) porte deux régions instables, qui sont responsables de sa virulence. Ces régions sur lesquelles les gènes codant pour une hémolysine et des fimbriae sont retrouvés, sont appelées îlots de pathogénicité I et II. Ils se trouvent respectivement en position 82 et 97. L'analyse des sites de jonction révèle que l'îlot de pathogénicité I est intégré dans le gène codant pour un ARNt<sup>Leu</sup> et que l'îlot II est intégré dans le gène codant pour un ARNt sélénocystéine. Les ARNt sont souvent utilisés comme sites d'intégration des phages et des plasmides, ce qui peut nous indiquer que ces îlots de pathogénicité dérivent de plasmides ou de phages. Des plasmides portant des gènes codant pour des hémolysines ont déjà été décrits précédemment et l'intégration de plasmides dans le génome est un phénomène connu [7].

Les questions concernant les mécanismes de transfert des îlots génomiques sont loin d'être résolues. Les événements de transferts horizontaux de gènes des îlots génomiques ont rarement été observés en laboratoire. Les îlots de pathogénicité des staphylocoques et de *V.cholerae* peuvent être transmis grâce à des bactériophages, l'îlot de symbiose de *Mesorhizobium loti* peut être mobilisé par conjugaison et l'îlot de pathogénicité de *Yersinia pseudotuberculosis* peut être mobilisé par des intégrases entre des gènes codant pour des ARNt différents sur un même chromosome [29]. Certains de ces îlots de pathogénicité comme les îlots de symbiose de *Mesorhizobium loti* ont d'ailleurs été classés par Burrus et al (2004) comme appartenant à la classe ICE à cause de leur capacité à s'exciser du chromosome pour donner une forme circulaire transférée dans une cellule receveuse par conjugaison.

### **3.6-Organisation modulaire des ICE :**

Les éléments génétiques mobiles comprennent les phages, les plasmides et les transposons. Ces éléments ont une organisation modulaire. La découverte de nouveaux

éléments tels que les ICE et leur comparaison avec les autres éléments mobiles connus ont permis de mettre en évidence que ces éléments résultaient de la combinaison de modules. Cette combinaison résulte de la pression de sélection conduisant au recrutement de fonctions essentielles à l'assemblage de nouveaux éléments génétiques mobiles. L'étude de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes codant pour des toxines et des gènes codant pour les voies cataboliques de détoxification entre les bactéries illustre le nombre important de voies qu'un gène donné peut utiliser pour coloniser les populations bactériennes. Le même gène peut appartenir à des transposons, des phages, des plasmides ou des transposons conjugatifs. Les IS sont souvent portées par des plasmides, des phages ou des ICE. Cette combinaison augmente le potentiel de transferts des gènes. De la même manière, les transposons conjugatifs gagnent des capacités de mobilisation intercellulaire en s'insérant dans le génome de phages ou de plasmides conjugatifs. En retour, ils fournissent aux phages et aux plasmides des capacités de mobilisation de nouveaux gènes dans la cellule où ils s'intègrent. La nature mosaïque des transposons conjugatifs est claire [8, 53]. En plus, des systèmes de recombinaison et de conjugaison qu'ils partagent avec les phages et les plasmides, certains transposons conjugatifs portent des gènes de résistance aux antibiotiques que l'on retrouve aussi dans certains transposons non conjugatifs. D'autres transposons conjugatifs portent des gènes de voies cataboliques que l'on retrouve dans des chromosomes bactériens ou des plasmides [65]. Nous allons illustrer la capacité des ICE à échanger leurs modules et montrer ce que de tels échanges peuvent apporter aux bactéries.

### **3.6.1- Définition des modules :**

Les gènes de différents éléments mobiles impliqués dans une même fonction sont groupés sous forme de modules ce qui est aussi le cas des modules des prophages et des plasmides. Ces modules sont au nombre de trois : un premier est impliqué dans le maintien, un deuxième dans la dissémination et le troisième dans la régulation des éléments qui les portent. Ces modules sont des gènes qui peuvent être échangés non seulement entre les éléments mobiles mais aussi entre les éléments mobiles et les chromosomes de l'hôte [12, 15].

### **3.6.2- Exemples d'échanges de modules :**

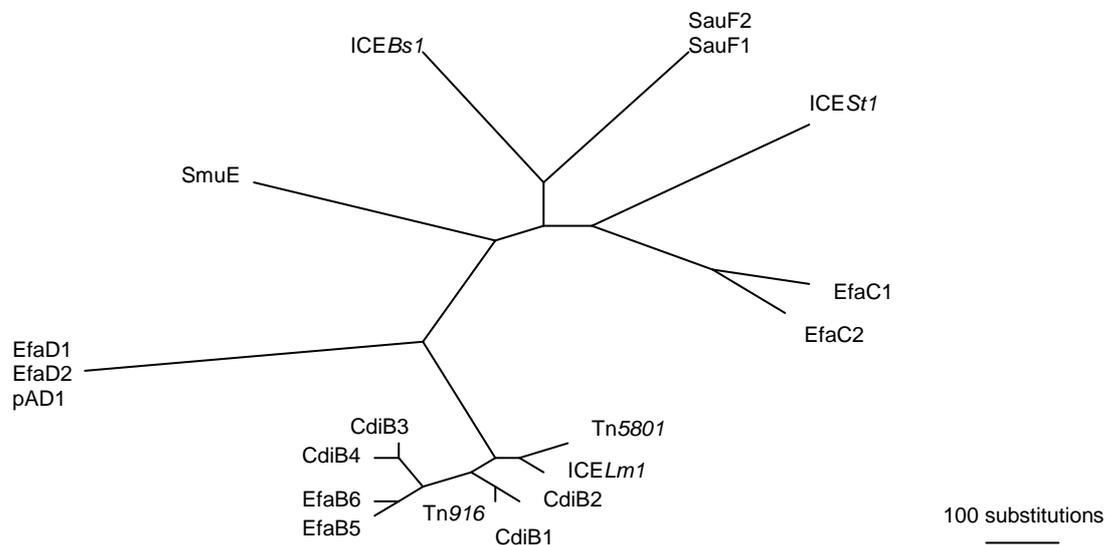
La comparaison de la structure et de l'organisation des gènes de Tn916 et de Tn5397 de *C.difficile* révèle que les modules de régulation et les gènes de résistance à la tétracycline sont clairement liés [53]. Cependant, leurs modules de recombinaison sont différents : Tn5397

code pour une recombinase appartenant à la famille des sérines alors que Tn916 code pour une recombinase de la famille des tyrosines. Le module de recombinaison de Tn916 est proche de celui de Tn1549 d'*Enterococcus* subspecies alors que leurs modules de conjugaison ne sont pas liés. La comparaison de plusieurs éléments mobiles montre de multiples échanges de modules de conjugaison et d'intégration. Ces échanges de modules peuvent aussi avoir lieu entre différents types d'éléments mobiles, c'est-à-dire entre des plasmides et des transposons conjugatifs/ICE ou des phages et des plasmides ou des ICE et des phages [12]. Les éléments SXT de *V.cholerae* et de R391 de *Providencia rettgeri* ont aussi été comparés avec l'élément R997 de *Proteus mirabilis* isolé en Inde et l'élément pMERPH de *Shewallena putrefaciens* isolé en Grande Bretagne. Ces quatre éléments génétiques mobiles R391, SXT, R997 et pMERPH sont caractérisés par la présence d'un système d'intégration proche de celui des phages  $\lambda$  et un système de conjugaison proche de celui des plasmides conjugatifs, suggérant que des recombinaisons de séquences d'ADN d'origines différentes sont une explication à leur évolution. Les ICE peuvent aussi acquérir de nouveaux modules par l'insertion d'un transposon non conjugatif. La région de 23 kb de l'élément SXT de *V.cholerae* codant pour la résistance au sulfaméthoxazole, au triméthoprime, à la streptomycine et au chloramphénicol a une structure similaire à celle des transposons non conjugatifs composites [12].

Les trois modules fonctionnels qui constituent les ICE peuvent incorporer d'autres gènes. La comparaison de la séquence de l'élément SXT de *V.cholerae* et de R391 de *Providencia rettgeri* montre que ces deux éléments ont en commun une séquence de 65 kb partageant plus de 95 % d'identité. Les modules de conjugaison, de régulation et d'intégration-excision de ces deux éléments sont très proches [9]. Ces deux éléments ont en commun le gène *int* situé à l'extrémité 5' qui code pour une intégrase de la famille des recombinases caractérisées par la présence de tyrosines, commune aux bactériophages et d'autres éléments génétiques mobiles tels que les ICE. Les déterminants du transfert de ces deux éléments sont organisés en quatre groupes occupant 25 kb et sont reliés avec les plasmides des groupes d'incompatibilité T, H et F. Cependant, chaque élément présente des acquisitions de séquences qui lui confèrent des propriétés particulières telles que la résistance à quatre antibiotiques pour SXT et la résistance au mercure et à la kanamycine pour R391. La plupart de ces acquisitions semblent être le résultat de recombinaisons avec des IS ou des recombinaisons homologues [9].

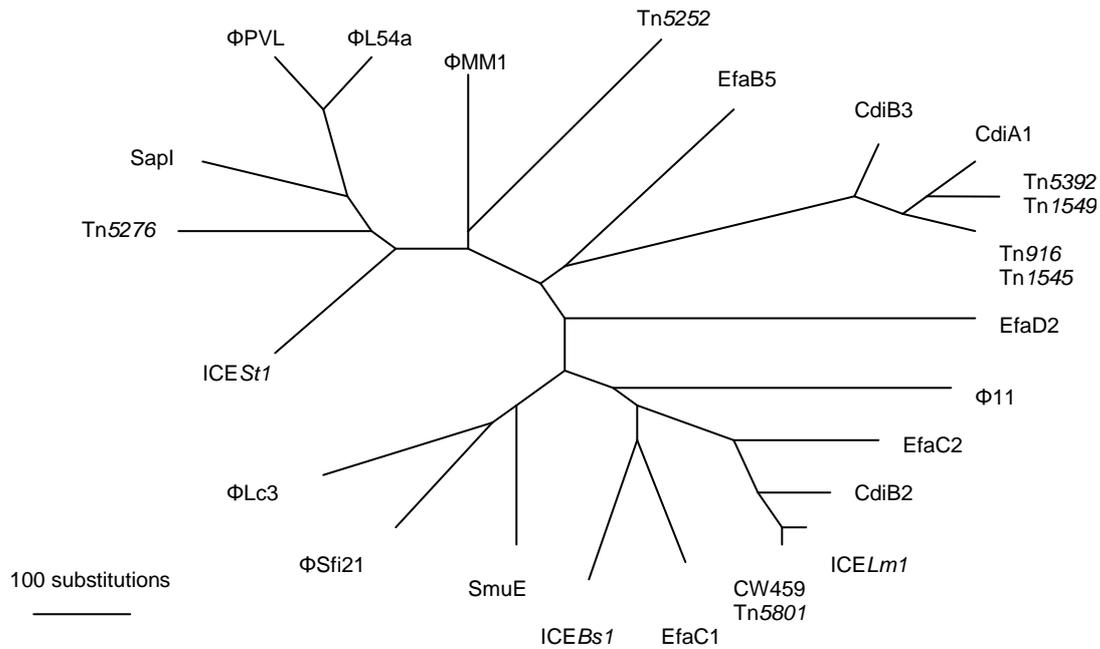
La comparaison des séquences connues des génomes d'ICE de bactéries Gram+ avec une faible teneur en bases G+C avec l'ICESt1 de *Streptococcus thermophilus*, le Tn916 d'*E.faecalis* et le Tn1549 d'*Enterococcus* subspecies a montré la présence de 18 modules de conjugaison codant chacun pour un minimum de 5 protéines. Par exemple, 7 modules de

conjugaison on été trouvés chez *C.difficile*, 7 chez *E.faecalis*, 2 chez *Streptococcus equi*, 1 chez *Streptococcus mutans* et 1 chez *Staphylococcus aureus*. La comparaison de ces séquences a permis d'établir des arbres phylogénétiques basés sur trois ORF conservés appartenant aux modules de conjugaison (Figure 5) [11].



**Figure 5 :** Représentation de l'arbre phylogénétique des ICE en fonction de trois ORF appartenant au module de conjugaison.

Six groupes d'éléments (CdiB1, CdiB2, CdiB3, CdiB4, EfaB6 et EfaB5) sont phylogénétiquement proches des éléments Tn916, Tn5801, ICELm1 et Tn5397 (Figure 5). Cette analyse phylogénétique suggère que les structures similaires de ces éléments ont été héritées d'un ancêtre commun. Les modules EfaC1 et EfaC2 codent pour des protéines ayant des points communs avec les protéines de l'ICESt1. L'ordre des ORF des éléments EfaC1 et EfaC2 codant pour ces protéines est identique pour les deux modules et leurs séquences nucléotidiques présentent 78-82 % d'identité, indiquant qu'ils dérivent d'un ancêtre commun. Cependant, une séquence de 5 370 pdb de EfaC1 est remplacée par une séquence différente de 11 240 pdb chez EfaC2. L'élément EfaC2 possède 4 ORF proches des gènes de conjugaison du plasmide des entérocoques pAD1 dont le transfert est sous la dépendance de phéromones peptidiques, incluant le gène *seal* impliqué dans l'exclusion cellulaire et *asa1* codant pour un facteur d'agrégation que ne possèdent pas l'élément EfaC2 d'*E.faecalis*. Ceci indique que des échanges de modules ont eu lieu entre les modules proches de l'élément ICESt1 et les modules de conjugaison des plasmides sous dépendance de phéromones [11].



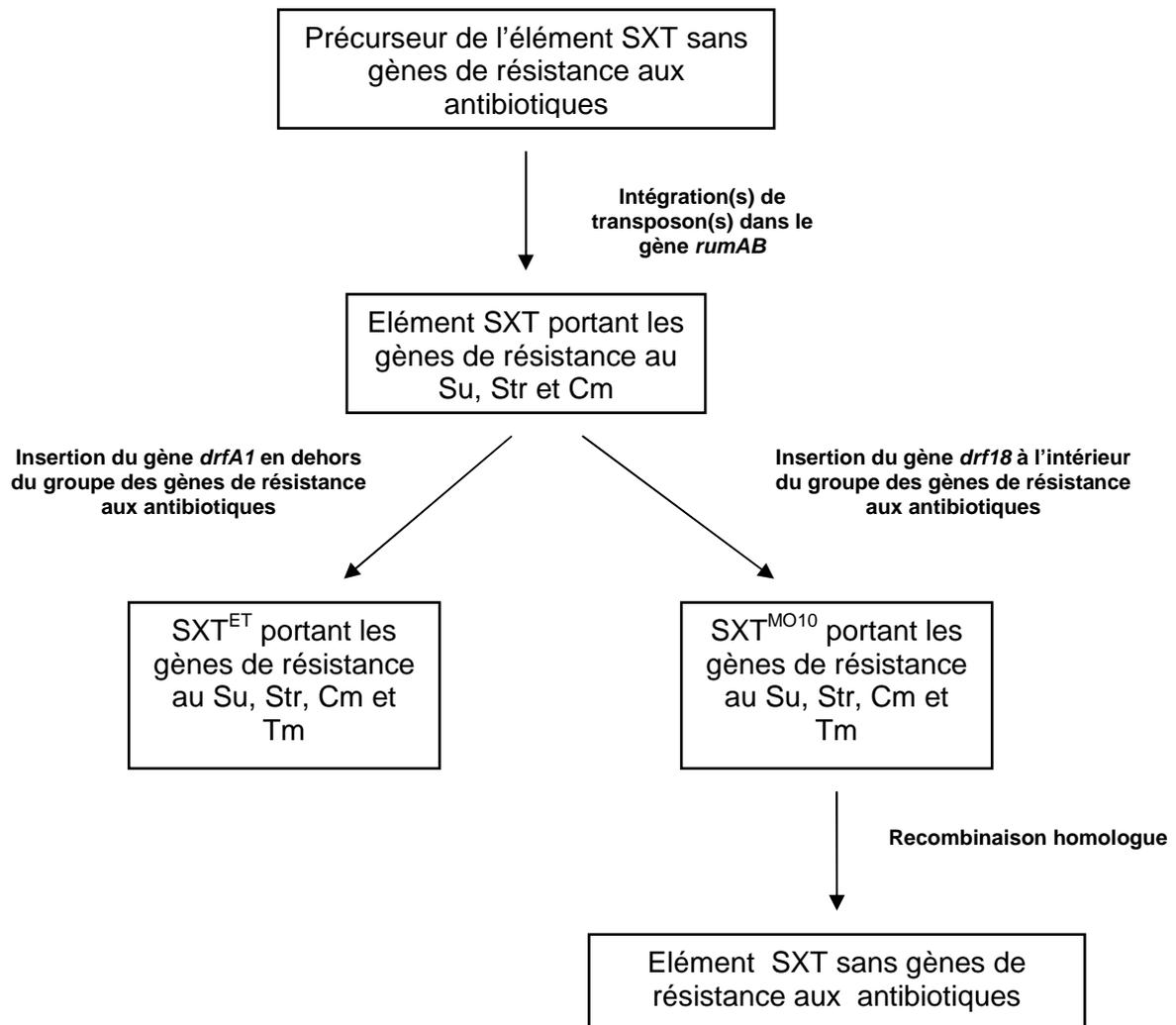
**Figure 6 :** Représentation de l’arbre phylogénétique des ICE en fonction de leur recombinase.

Les modules de conjugaison très proches des éléments EfaC1 et EfaC2 sont associés à des gènes codant pour des recombinases caractérisées par la présence de résidus tyrosines différents. Le module d’intégration de l’élément EfaC1 code pour une recombinase proche de celle codée par l’élément *ICEBs1* alors que celui de l’élément EfaC2 code pour une recombinase proche de celle codée par l’élément CdiB2. De plus, les gènes *int* des éléments EfaC1 et EfaC2 ont des positions différentes. Les éléments CW459, Tn5801 et *ICELm1* codent pour des intégrases qui sont proches des éléments CdiB2 et EfaC2 (Figure 6). Cependant les modules de conjugaison de EfaC2 sont proches de ceux de l’élément Tn1549, alors que l’élément CdiB2 et les modules de conjugaison des éléments CW459, Tn5801 et *ICELm1* sont proches de ceux de l’élément Tn916 [53].

Ainsi, de multiples échanges des modules de conjugaison, d’intégration et de régulation ont eu lieu pour un grand nombre d’éléments conjuguatifs. Une analyse détaillée des relations entre les gènes appartenant aux modules de conjugaison et d’intégration montre que des échanges ont eu lieu avec d’autres éléments de bactéries Gram+, tels que des plasmides, des prophages et des transposons.

### 3.6.3- Exemple d'évolution des modules de l'élément SXT de *V.cholerae* :

*V.cholerae* est l'agent responsable du choléra. Cette maladie provoque une diarrhée sévère, souvent létale. Avant 1992, seul le sérotype O1 de *V.cholerae* était identifié lors des épidémies de choléra et les gènes de résistance aux antibiotiques de ces bactéries étaient portés par des plasmides. A partir de 1992, un nouveau sérotype désigné *V.cholerae* O139 émergea en Inde et au Bangladesh. Les isolats appartenant à ce sérotype possédaient un nouvel élément génétique transmissible appelé SXT portant les gènes de résistance au sulfaméthoxazole, au triméthoprime, au chloramphénicol et à de faibles concentrations de streptomycine [31]. Après la grosse épidémie de choléra due à *V.cholerae* O139, la souche El Tor O1 de *V.cholerae* réapparut en 1994 comme agent principal de choléra sur le continent indien. Cette nouvelle souche El Tor O1 de 1994 était résistante au sulfaméthoxazole, au triméthoprime, au chloramphénicol et à la streptomycine comme les isolats O139. Ces gènes de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés sur un élément proche mais pas identique à l'élément SXT de la souche O139. Les souches O139 isolées récemment ne sont plus résistantes au sulfaméthoxazole et au triméthoprime, par contre elles possèdent toujours un élément SXT intégré dans l'extrémité 5' du gène *prfC*. Les gènes de résistance aux antibiotiques de l'élément SXT de *V.cholerae* O139 isolé en 1992 sont groupés dans une structure de 17 kb ressemblant à une structure de transposon composite. Une région de 3,3 kb comprenant le gène *drf18* est présente dans l'élément SXT de *V.cholerae* O139 mais absente de l'élément SXT retrouvé dans l'isolat El Tor O1 isolé en 1994. Le gène *drf18* code pour une dihydrofolate réductase impliquée dans la résistance au triméthoprime chez *V.cholerae* O139. Mais, l'élément SXT de l'isolat El Tor O1 de 1994 possède une nouvelle structure comprenant le gène *dfrA1*, localisée à 70 kb des autres gènes de résistance aux antibiotiques. Le gène *dfrA1* code lui aussi pour une dihydrofolate réductase impliquée dans la résistance au triméthoprime. Les différences entre les gènes de résistance aux antibiotiques de ces éléments SXT suggèrent que ces gènes ne sont pas des caractéristiques intrinsèques de cette famille d'ICE. Il semble que les gènes codant pour la résistance aux antibiotiques se soient insérés dans ces éléments pour devenir transmissibles au sein de la population bactérienne. La pression de sélection par les antibiotiques ne semble pas être la seule explication de la dissémination et de la persistance des éléments de la famille SXT au sein des espèces de *V.cholerae* en Asie. Les gènes de résistance aux antibiotiques sont absents de certains isolats récents de *V.cholerae* O139 comme la souche 2055. Un schéma possible des étapes d'acquisition et de perte de ces gènes a été proposé par Hochhut et al Nov 2001 (Figure 7).



**Figure 7** : Etapes possibles d'acquisition et de perte des gènes de résistance aux antibiotiques proposées par Hochhut et al Nov 2001.

Dans un premier temps, un transposon possédant les gènes de résistance au sulfaméthoxazole (Su), à la streptomycine (Str) et au chloramphénicol (Cm) s'est inséré dans un gène de l'élément SXT appelé *rumAB*, un gène resté intact pour l'élément R391 de *Providencia rettgeri*. Cet élément avec ces trois gènes de résistance aux antibiotiques a acquis les gènes de résistance au triméthoprime soit grâce au gène *dfrA1* pour *V.cholerae* E1 Tor O1 pour donner un élément appelé SXT<sup>ET</sup>, soit le gène *dfr18* pour *V.cholerae* O139 pour donner un élément appelé SXT<sup>MO10</sup>. Ensuite, les gènes de résistance aux antibiotiques ont subi une ou plusieurs délétions par recombinaisons homologues pour donner les ICE retrouvés dans la souche 2055 de *V.cholerae* O139. Bien que SXT<sup>MO10</sup> soit le premier élément découvert et que

SXT<sup>ET</sup> ne soit pas mis en évidence dans les souches de type O1 avant 1994, il semble impossible que SXT<sup>MO10</sup> soit le précurseur immédiat de SXT<sup>ET</sup> étant donné les différences entre les gènes de résistance aux antibiotiques. Il semblerait que SXT<sup>ET</sup> ait évolué indépendamment de l'élément SXT<sup>MO10</sup> [31].

### 3.6.4- Conséquences de l'échange de modules

Les éléments Tn5397 de *C.difficile* et CW459tet(M) de *C.perfringens* portent un gène de résistance à la tétracycline qui ressemble à celui du Tn916 d'*E.faecalis*. Ils ont des régions de conjugaison similaires mais ils ont des modules d'excision et d'insertion différents ce qui prouve que l'échange de modules permet aux gènes de résistance à la tétracycline d'être transférés à des espèces bactériennes différentes par des mécanismes de conjugaison similaires en adaptant les modules d'excision et d'intégration à leur hôte [53].

Les éléments EfaC1 et EfaC2 d'*E.faecalis* ont des modules de conjugaison très proches mais codent pour des recombinases différentes. L'analyse des séquences montre que EfaC1 est intégré de façon site spécifique dans l'extrémité 3' du gène codant pour l'ARNt<sup>Thr</sup>, alors que EfaC2 est intégré de façon site spécifique à l'extrémité 3' du gène codant pour une GMP synthétase. Ceci suggère que les échanges et acquisitions de modules ont conduit aux variations de la spécificité des sites d'intégration [11].

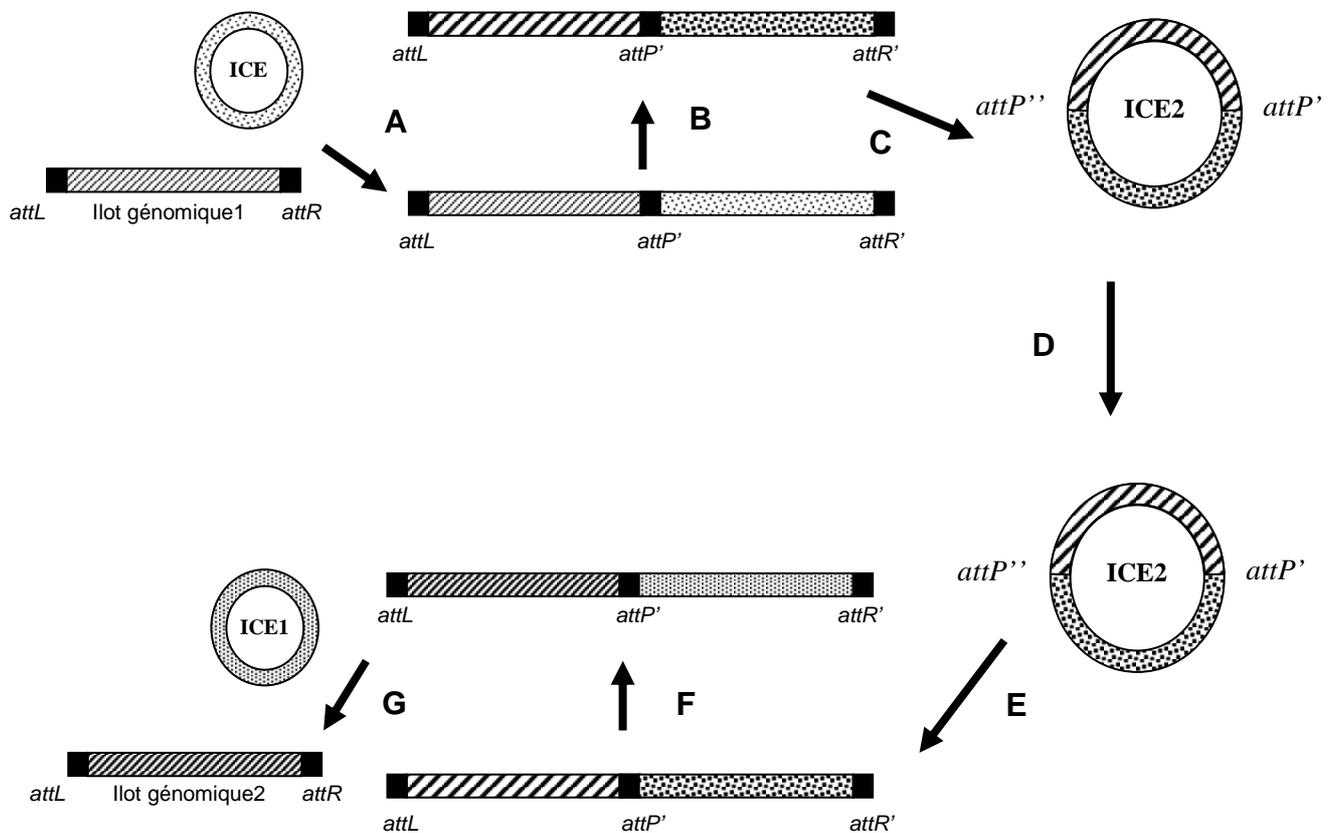
En plus des modules nécessaires au maintien, à la dissémination et à la régulation des ICE, ils ont acquis d'autres séquences qui leur confèrent des propriétés spécifiques. Initialement, les ICE ont été identifiés car ils portaient des gènes de résistance aux antibiotiques. Puis, les séquences de plusieurs ICE ont été identifiées et on s'est rendu compte que de nombreuses propriétés étaient acquises par ces éléments. Les ICE contiennent souvent des gènes qui permettent à leur hôte de croître dans des environnements hostiles, en présence d'antibiotiques ou de métaux lourds. D'autres ICE codent pour des voies de dégradation complexe de composés toxiques comme les composés aromatiques. Certains ICE contiennent des gènes de biosynthèse de composés antimicrobiens tels que la nisine l'antibiotique par le Tn5276 de *L.lactis*. D'autres fonctions sont codées par les ICE telles que des systèmes de réparation de l'ADN de Tn5252 de *Streptococcus pneumoniae* et le système de recombinaison de SXT et R391 qui semble participer à la plasticité des ICE. Les ICE peuvent permettre à leur hôte d'occuper de nouvelles niches écologiques. L'ICE isolé chez *Mesorhizobium loti*, connu en tant qu'îlot de symbiose, porte des gènes qui permettent à la bactérie de croître symbiotiquement avec les racines de plantes. Les gènes codent pour des enzymes diverses de biosynthèse requises pour la fixation de l'azote et permettant la symbiose [15].

Les ICE sembleraient être capables de coder pour des facteurs de virulence. *Bartonella tribocorum* est un pathogène supposé isolé dans le sang de rat. Un îlot de pathogénicité, trw-Pai, code pour un système de sécrétion de type IV très proche de ceux des systèmes de transfert d'ADN des plasmides à spectre d'hôte large : R388, pKM101 et RP4. Ce système de sécrétion de type IV est nécessaire à la croissance de *B.tribocorum* dans les érythrocytes. Un gène *int* tronqué est adjacent à une région codant pour ce système suggérant que cet élément dérive d'un ICE qui n'est plus auto-transmissible mais qui permet à *B.tribocorum* de croître dans les érythrocytes en contrôlant la libération de protéines via le système de sécrétion de type IV. *Salmonella enterica* sérovar Typhi, l'agent responsable de la fièvre typhoïde, possède un îlot de pathogénicité appelé SPI-7 de 134 kb intégré dans un gène codant pour un ARNt<sup>Phe</sup>. SPI-7 porte le groupe de gènes *viaB* qui code pour les enzymes de biosynthèse et de transport de l'antigène Vi, un exopolysaccharide composant la capsule. Chez *E.coli* ECOR31, un nouvel ICE appelé ICE*Ec1*, porte l'îlot de pathogénicité, précédemment identifié chez *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*, qui code pour un facteur de virulence, la yersiniabactine, un système sidérophore [15].

Les ICE participent à la plasticité des génomes. Le locus *fda* de la bactérie *Streptococcus thermophilus* semble être le site d'insertion pour l'intégration de cet ICE et fournit une illustration de la diversité intra-espèce pour un locus donné générée par l'intégration des ICE. Les comparaisons des séquences des loci *fda* de plusieurs souches de *Streptococcus thermophilus* révèlent un très haut degré de polymorphisme associé avec une séquence de 27 pdb qui inclue la terminaison 3' du gène *fda*. De plus, un autre ICE et 5 îlots génomiques ont été détectés dans la région du gène *fda* dans plusieurs souches de *Streptococcus thermophilus*.

L'ICE *clc* de *Pseudomonas* subspecies B13 s'intègre dans le gène codant pour un ARNt<sup>Gly</sup> comme PAGI-2 de *Pseudomonas aeruginosa*, PAGI-3 de *Pseudomonas aeruginosa* SG17M et un îlot génomique de 67 kb appartenant à *Xylella fastidiosa*. Ces trois derniers éléments codent pour une recombinase de la famille des tyrosines identiques à celle trouvée pour l'élément *clc*. Bien que ces éléments soient identiques sur une grande partie de leur séquence, ils portent des séquences spécifiques codant pour des fonctions incluant la résistance aux métaux lourds, le transport et le métabolisme des acides aminés, des coenzymes, des cations et des porphyrines, et la biogenèse de cytochromes. Les ICE contribuent donc à la plasticité des génomes mais leur structure individuelle est aussi plastique. Les ICE évoluent car ils contiennent des gènes et des séquences, tels que des recombinases et des séquences d'insertion, qui facilitent le recrutement d'autres gènes. Les ICE peuvent perdre leur capacité d'auto-transfert. Les raisons de cette perte peuvent être dues

soient à des mutations à l'intérieur de l'ICE soient dues à l'hôte. Par exemple, chez *S.thermophilus* et *L.lactis*, le Tn916 ne peut pas être mobilisé vers une cellule receveuse. Dans certains cas, les îlots génomiques semblent dériver d'ICE mais les hôtes qui les possèdent ne sont plus capables d'assurer leur dissémination. Les systèmes d'intégration, qui permettent à la plupart des ICE d'intégrer un site unique du chromosome, semblent représenter une adaptation qui permet le regroupement des gènes de transfert à un locus conservé des chromosomes bactériens. Les îlots génomiques et de pathogénicité sont souvent retrouvés à des loci conservés. Le regroupement des gènes de transfert dans les îlots génomiques semble faciliter leurs échanges entre bactéries par des éléments auto-transmissibles (ICE ou phages) qui partagent des systèmes d'intégration similaires.



**Figure 8** : Etapes du modèle de mobilisation proposées par Burrus et al 2004.

(A) Un ICE entre dans un nouvel hôte qui possède un îlot génomique intégré dans un site cible conservé. L'intégrase catalyse l'intégration de cet ICE dans le site d'attachement droit *attR* de l'îlot génomique. (B) Cette structure subit des mutations qui conduisent à la perte et à l'acquisition de fragments d'ADN et l'environnement conduit à la sélection des

éléments les plus avantageux pour l'hôte. (C) Puisque l'îlot génomique et l'ICE ont des sites d'attachement compatibles, l'intégrase peut catalyser l'excision et la circularisation d'un élément plus grand appelé ICE2 qui possède deux sites d'attachement similaires. (D) ICE2 peut être transféré à un nouvel hôte qui n'est pas nécessairement proche du premier hôte qui a reçu le premier ICE. (E) ICE2 intègre un site cible conservé chez le nouvel hôte en utilisant un des deux sites d'attachement présent chez ICE2. Le nouvel hôte peut posséder des îlots génomiques différents codant pour des fonctions différentes mais possédant des sites d'attachement compatibles avec ICE2. (F) Une fois de plus cette ICE2 peut subir chez son nouvel hôte des modifications de sa séquence. (G) L'ICE peut s'exciser indépendamment de l'îlot génomique par des recombinaisons entre les sites d'attachement de l'ICE. Le résultat de ce type de mécanisme est la dissémination des îlots génomiques par un ICE et l'évolution rapide des deux éléments. Il est possible que l'îlot génomique puisse être en fait un autre ICE comme il a été rapporté pour les éléments SXT de *V.cholerae* et R391 de *Providencia rettgeri*.

Toutes ces données sont issues de données expérimentales obtenues *in vitro*. On est en droit de se demander ce qu'il en est dans la nature. De tels transferts semblent avoir lieu dans la nature puisque le gène *tetM* porté par Tn916 a été retrouvé dans de nombreux isolats naturels, incluant plusieurs genres de bactérie Gram+ et des espèces de bactérie Gram- telles que *Nesseiria gonorrhoeae* et *Kingella* subspecies [22, 61]. Les transposons conjugatifs de *Bacteroides* semblent largement répandus dans la nature. Le même transposon conjugatif CTnDOT a été retrouvé dans un nombre important de *Bacteroides* subspecies démontrant que le transfert de cet élément a lieu avec une fréquence importante au niveau du colon. Ce transposon conjugatif a été retrouvé dans le génome des isolats cliniques de bactéries anaérobies de la sphère orale : *Prevotella intermedia* et *Prevotella denticola*. Il existe donc des transferts de transposons conjugatifs entre les bactéries du colon et de la sphère orale. Le plus surprenant est que le gène *tetQ* des isolats de *Bacteroides* a pu être retrouvé dans des isolats naturels de *Prevotella ruminicola*, une espèce retrouvée dans le rumen et l'intestin des animaux de rente. Ceci suggère que des transferts d'ADN entre les flores résidentes des animaux et des humains ont lieu dans la nature [58].

Nous venons de voir que les propriétés des ICE ne sont que partiellement connues. De plus, ces éléments semblent être largement répandus au sein des bactéries, notamment chez les mycoplasmes où l'ICEF de *M.fermentans* a été identifié. Chez *M.agalactiae* et *M.bovis*, des éléments proches ont été découverts et nous allons décrire les modalités de leur mise en évidence.



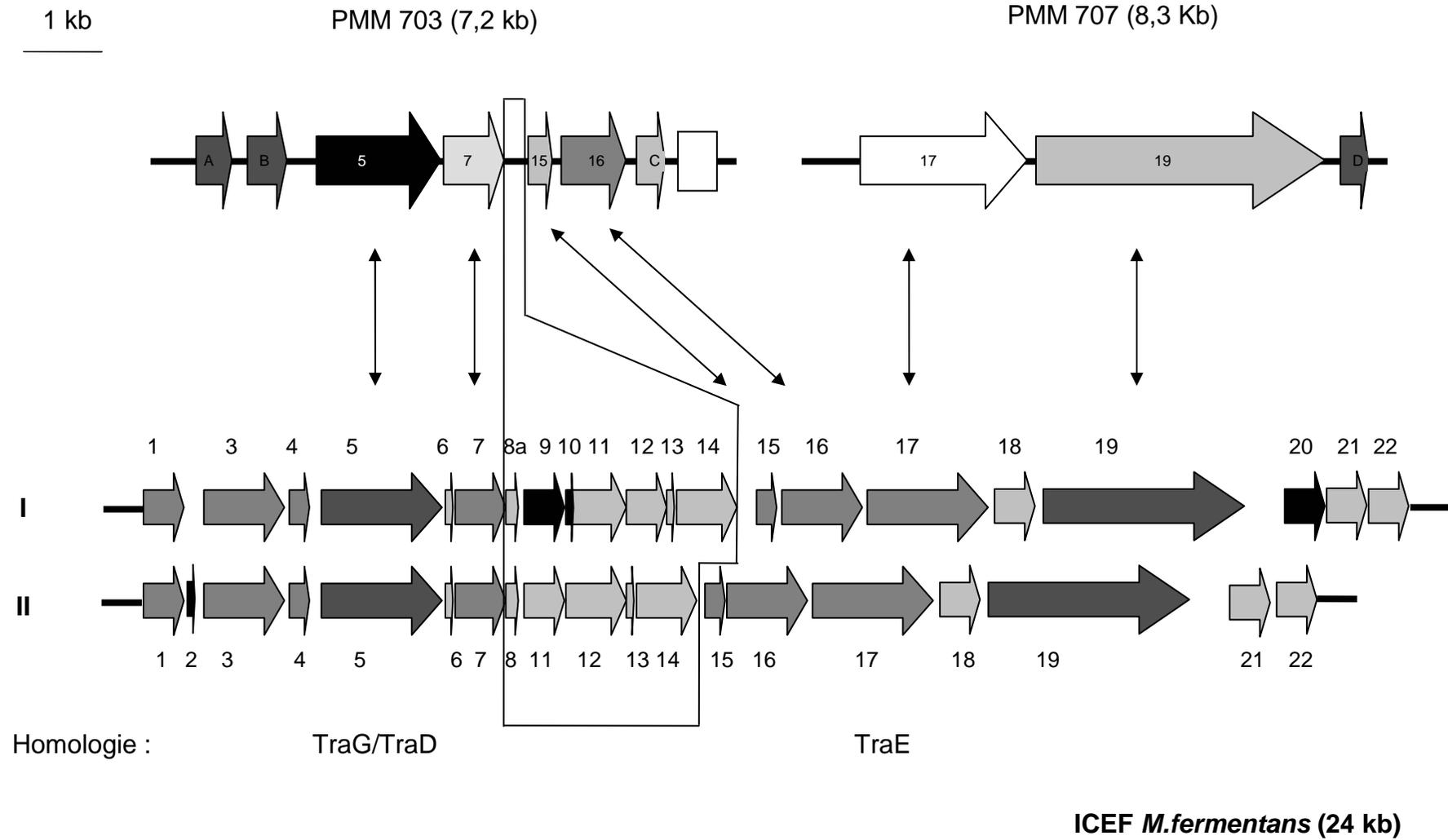
## **Partie II : Partie expérimentale**

## 1/ Introduction :

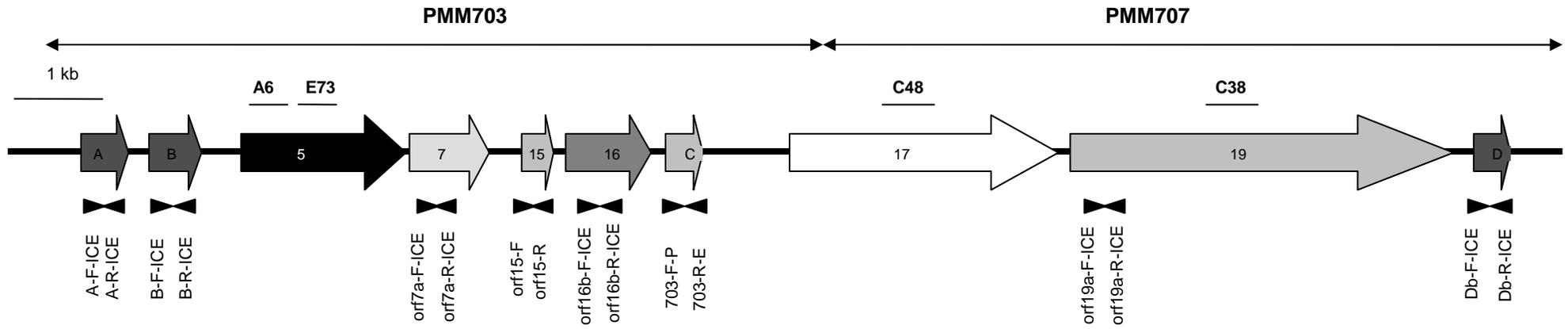
Notre étude consiste à poursuivre les recherches entreprises au laboratoire de mycoplasmologie de l'ENVT au sujet des séquences découvertes grâce à l'hybridation soustractive suppressive (HSS) utilisée pour évaluer la diversité génomique entre *M.agalactiae* et *M.bovis*. L'HSS a permis d'identifier des séquences présentes dans le génome de la souche type PG45 de *M.bovis* mais absentes du génome de la souche type PG2 de *M.agalactiae*. Une des séquences spécifiques de la souche type PG45 de *M.bovis* appelée BOV73 code potentiellement pour un peptide présentant une homologie (42 % d'identité et 61 % de similarité) avec la partie centrale d'une protéine putative appartenant à un élément intégratif et conjugatif présent dans la souche PG18 de *M.fermentans* découvert par Calcutt et al 2002 (Figure 9); cette protéine putative est codée par l'ORF5 de l'ICEF. Pour cet ICEF, 22 ORF ont été identifiés avec une taille comprise entre 54 et 1 409 pdb. Pour cette souche, quatre copies de l'ICEF ont été mises en évidence. Parmi ces quatre copies, une possède une configuration différente des trois autres copies. La copie unique est appelée type I et les trois autres types II (Figure 9). Ces deux configurations ont une très forte similarité. La copie de type I diffère du type II par la présence de 3 ORF supplémentaires (9, 10 et 20) et l'absence de l'ORF2. L'ORF5, auquel la séquence BOV73 de *M. bovis* (souche PG45) correspond, est similaire aux produits de gènes impliqués dans des fonctions de mobilité de l'ADN. L'ORF5 possède une forte homologie avec la famille des gènes *traG/traD*. Ce gène porte différents noms, selon les systèmes considérés par exemple il code pour la protéine PCP51 dans le plasmide pCP13 de *C.perfringens* et pour la protéine TrsK dans le transposon conjugatif Tn1549 d'*E.faecalis*. Le prototype de cette famille, la protéine TraG du plasmide RP4 est essentielle pour la conjugaison et semble pouvoir se coupler au relaxosome pour la formation du pore d'accouplement. Les membres de la famille TraG ont conservé un domaine de fixation aux nucléotides et se localisent dans la membrane cytoplasmique. L'ORF17 code potentiellement pour une protéine présentant une homologie avec la famille des protéines de conjugaison TraE/TrsE. Le produit putatif de l'ORF17 présente une forte similarité avec la protéine TraE de *M.pulmonis* et TraE du plasmide pMRC01 de *L.lactis*. La protéine TraC du plasmide F d'*E.coli* est aussi un membre de cette famille. La fonction des protéines de la famille TraE est inconnue. Les membres de cette famille possèdent des sites de fixation pour les NTP et sont associés à la membrane. Les ORF7, 15, 16 et 19 sont supposés coder pour des protéines comportant des domaines transmembranaires. Le produit de l'ORF19 contient une séquence signal à l'extrémité N-terminale. Peu de choses sont connues sur les peptidases

signal des mycoplasmes. Il n'est donc pas possible de prédire si le produit de l'ORF19 est clivé ou si le peptide signal hydrophobe sert à l'ancrage de cette protéine dans la membrane.

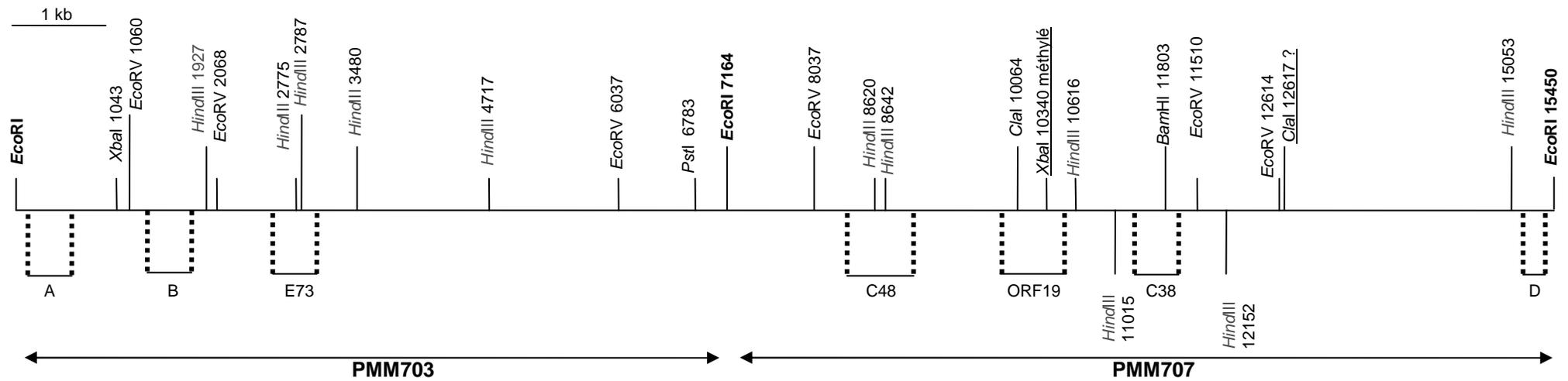
L'HSS a aussi été utilisée pour identifier des séquences présentes dans le génome de la souche 5632 de *M.agalactiae* mais absentes de la souche type PG2 de *M.agalactiae*. La souche 5632 a été choisie car elle possède diverses séquences, dont un répertoire de gènes *vpma* différents de ceux de la souche type PG2 témoignant de la différence en terme génomique entre ces deux souches. Trois séquences issues de la soustraction 5632 moins PG2, appelées A6, C38 et C48 présentaient comme la séquence BOV73 une homologie avec diverses portions de l'ICEF de la souche PG18 de *M.fermentans* (Figure 9). Ces séquences ont été utilisées pour cloner deux fragments d'ADN génomique de la souche 5632 de *M.agalactiae* ; le fragment *EcoRI* appelé 703 qui porte les séquences A6 et E73 et le fragment 707 qui porte les séquences C38 et C48. Les séquences de ces deux fragments ont été déterminées et analysées ; plusieurs ORF ont été définis. Après avoir démontré que les séquences 703 et 707 sont adjacentes et colinéaires au locus correspondant dans le chromosome de la souche 5632 de *M.agalactiae*, nous avons démontré par hybridation sur Southern que les souches 3990, 5632 et 8064 de la collection *M.agalactiae* et que 40 souches de la collection *M.bovis* dont la souche type PG45 possédaient un tel élément. Par contre, aucune des souches de la collection *M.agalactiae* des Pyrénées Atlantiques ne possédait cet élément. Les séquences 703 et 707 étaient des fragments *EcoRI*, pour les régions génomiques flanquantes à ces fragments, des digestions simples de l'ADN génomique des souches 3990, 5632 et 8064 de *M.agalactiae* et des digestions doubles de l'ADN génomique de la souche 5632 ont été réalisées. Elles ont permis pour la souche 5632 non seulement d'avoir une idée de la position de certains sites de restriction en dehors des sites *EcoRI* mais aussi ces digestions ont permis de suggérer la présence de plusieurs copies.



**Figure 9** : Organisation et comparaison avec l'ICEF de *M.fermentans* des séquences clonées 703 et 707.



**Figure 10 :** Positions des différentes sondes et amorces utilisées pour les différentes PCR



**Figure 11 :** Carte de restriction des séquences d'ADN 703 et 707 et positions des sondes utilisées pour reconnaître les différents fragments de restriction.

## **2/ Résultats :**

### **2.1- Analyse de la séquence partielle de l'ICE de la souche 5632 de *M. agalactiae* :**

Les séquences 703 et 707 ont été obtenues à partir d'une banque génomique de la souche 5632 de *M. agalactiae*. La séquence 703 présente 7 ORF complets et la séquence 707 comporte 3 ORF (Figure 9). Certains de ces ORF codent potentiellement pour des produits homologues avec certaines protéines codées par l'ICEF de la souche PG18 de *M. fermentans* découvert par Calcutt et al (2002). La comparaison des séquences 703 et 707 avec l'ICEF a révélé des ORF communs, il s'agit des ORF5, 7, 15, 16, 17 et 19. Par contre, 3 ORF (A, B, C et D) sont spécifiques aux séquences 703 et 707, ces ORF n'existent pas dans la séquence de l'ICEF. La séquence 703 présente par rapport à l'ICEF une délétion de la région portant les ORF8 à 14. La plupart de ces ORF n'ont pas d'homologie avec des séquences connues, mais parmi les ORF communs à l'ICEF et aux séquences 703 et 707 les ORF5, 17 et 19 présentent des homologies avec d'autres ORF dont les produits codent pour des protéines impliquées dans le transfert de gènes. 6 des 8 ORF de la région délétée de la séquence 703 codent pour des protéines qui présentent des motifs de protéines cytoplasmiques.

Pour les ORF spécifiques des séquences 703 et 707, l'ORFD présente une homologie avec une protéine de phage que l'on retrouve chez *M. mycoides* subspecies *mycoides* SC.

### **2.2- Mise en évidence de la colinéarité des séquences 703 et 707 au locus chromosomique correspondant dans la souche 5632 de *M. agalactiae* :**

D'après les données de la séquence des fragments de restriction *EcoRI* 703 et 707, nous avons formulé l'hypothèse que le site *EcoRI* situé en 3' dans la séquence 703 pouvait être le même que celui situé en 5' dans la séquence 707. En fusionnant les deux fragments 703 et 707 au site *EcoRI* mentionné, il est alors possible de définir un ORF, chevauchant ce site *EcoRI*, et dont le produit aligne sans "gap" avec le produit de l'ORF17 de l'ICEF. Ceci a donc été vérifié expérimentalement.

Dans notre hypothèse, l'amplification de l'ADN génomique de la souche 5632 de *M. agalactiae* avec le couple d'amorces 703-F-P et 707-R-E (Figure 10) donne théoriquement un fragment de 583 pb d'après la séquence des fragments 703 et 707. La digestion de ce fragment amplifié par PCR par les enzymes de restriction *PstI* et *EcoRI* donne théoriquement

pour chacune de ces enzymes deux fragments dont les tailles théoriques sont de : 450 pdb et 133 pdb avec *Pst*I et de 520 pdb et 63 pdb avec *Eco*RI. Un fragment PCR a effectivement été obtenu avec les amorces 703-F-P et 707-R-E, et ce produit a été digéré par *Pst*I ou *Eco*RI ; les tailles du fragment et de ses produits de digestion ont été estimées sur gel d'agarose et correspondent à celles attendues d'après le séquençage des fragments 703 et 707 (résultats non montrés), confirmant ainsi que les fragments 703 et 707 sont adjacents dans le chromosome de la souche 5632.

### **2.3- Identification par Southern blot des souches de la collection *M.agalactiae* et *M. bovis* qui possèdent l'ICE :**

Les membranes portant les ADN génomiques des souches de la collection *M.agalactiae* et de la collection *M.bovis* ont été hybridées avec différentes sondes (A, B, C, D, ORF7, ORF15, ORF16 (Figures 12 et 13), ORF19, E73, C38 et C48) dans des conditions de stringence forte (Cf. Matériels et méthodes), pour identifier les souches qui possédaient ces séquences d'ICE et pour déterminer quels ORF étaient présents. L'ADN génomique des souches était digéré par l'enzyme de restriction *Eco*RI.

| Souches     | Sondes utilisées               |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                |                                 |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|             | A                              | B                              | E73                            | ORF7                           | ORF15                          | ORF16                          | C                               | C48                             | ORF19                          | C38                            | D                               |
| PG2         |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 9           |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 190         |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 209         |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 332         |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| <b>3990</b> | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                               | +                               | +                              | +                              | +                               |
| 4021        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 4025        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 4054        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                |                                 |
| 4055        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                |                                 |
| 4210        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 4212        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 4258        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 5210        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 5225        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| <b>5632</b> | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                              | +                               | +                               | +                              | +                              | +                               |
| 5670        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 5725        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 5826        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                |                                 |
| 6833        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 6968        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 7169        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 7314        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 7327        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 7375        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 7784        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 8062        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                |                                 |
| 8063        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                |                                 |
| <b>8064</b> | + 2 bandes<br>dont 1<br>faible | + 3 bandes<br>dont 2<br>faibles | + 3 bandes<br>dont 2<br>faibles | + 2 bandes<br>dont 1<br>faible | + 2 bandes<br>dont 1<br>faible | + 3 bandes<br>dont 2<br>faibles |
| 8750        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 9385        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 9600        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| 9875        |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                 |                                 |                                |                                | + faible                        |
| Total       | 3                              | 3                              | 3                              | 3                              | 3                              | 3                              | 3                               | 3                               | 3                              | 3                              | 28                              |

**Tableau 5** : Résultats des Southern blot sur la collection *M.agalactiae*. (Cf. texte pour les détails)

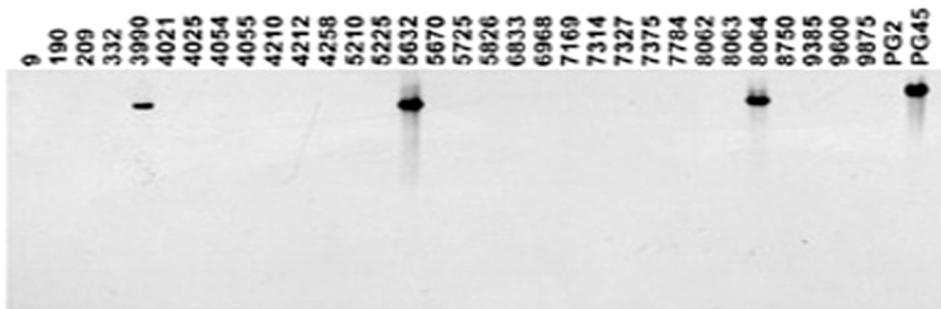
Les croix indiquent qu'une bande était présente. Lorsque les bandes sont de faible intensité le mot faible est rajouté. Lorsque plusieurs bandes sont présentes leur nombre est indiqué ainsi que leur intensité. Le total indique le nombre de souches reconnu par la sonde testée.

| Souches | Sondes utilisées |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
|---------|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|--------|
|         | A                | B          | E73        | ORF7       | ORF15      | ORF16      | C          | C48      | ORF19    | C38      | D      |
| PG45    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 2000    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 2038    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 2040    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 2041    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 2094    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 2209    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 2260    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 3724    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 4235    | + 2 bandes       | + 2 bandes | + 2 bandes | + 2 bandes | + 2 bandes | + 2 bandes | + 2 bandes | +        | +        | +        |        |
| 4785    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 5268    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 6655    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 6667    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 6692    | + 2 bandes       | + 2 bandes | +          | + 2 bandes | + 2 bandes | +          | + 2 bandes | +        | +        | +        |        |
| 6719    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 6725    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 6733    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 6743    | + faible         | + faible   | + faible   |            | + faible   | + faible   | + faible   | + faible | + faible | + faible |        |
| 6782    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | + faible |        |
| 7224    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 7515    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 7761    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 8919    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | + faible |        |
| 9408    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 9519    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 9555    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 9583    | + 2 bandes       | + 2 bandes | +          | + 2 bandes | + 2 bandes | +          | + 2 bandes | +        | +        | +        |        |
| 9591    | + 2 bandes       | + 2 bandes | +          | + 2 bandes | + 2 bandes | +          | + 2 bandes | +        | +        | +        |        |
| 9760    | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 9804    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 9903    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 9910    |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 10182   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | + faible |        |
| 10202   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10205   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10223   |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 10230   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | + faible |        |
| 10237   |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 10242   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10256   |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 10280   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10445   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10446   |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 10516   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10517   | + faible         | + faible   | +          | +          | +          | +          | +          | +        | + faible | + faible |        |
| 10632   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 10807   | + faible         | + faible   | + faible   | + faible   | + faible   | + faible   | + faible   | + faible | + faible | + faible |        |
| 10973   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 11362   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 11368   | + faible         | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | + faible |        |
| 11436   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 11479   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 12111   |                  |            |            |            |            |            |            |          |          |          |        |
| 12335   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 12597   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| 12670   | +                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +        | +        | +        |        |
| Total   | 39               | 40         | 40         | 38         | 39         | 40         | 40         | 40       | 40       | 40       | Aucune |

**Tableau 6** : Résultats des Southern blot sur la collection *M.bovis*. (Cf. texte pour les détails)

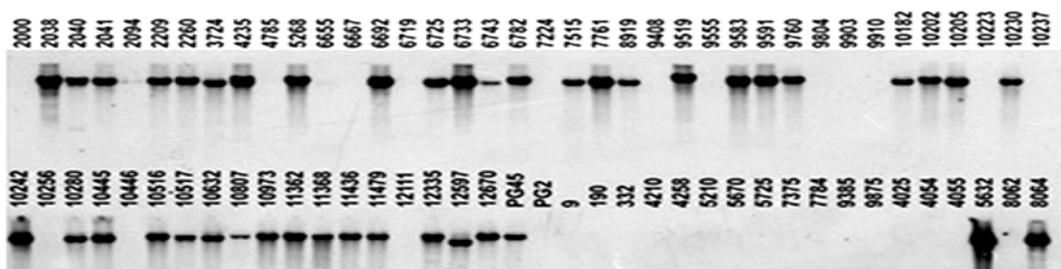
\* Pour ces souches, le signal émis par la sonde ORF16 est trop fort et il ne permet pas de voir s'il y a une ou deux bandes.

Les croix indiquent qu'une bande était présente. Lorsque les bandes sont de faible intensité le mot faible est rajouté. Lorsque plusieurs bandes sont présentes leur nombre est indiqué ainsi que leur intensité. Le total indique le nombre de souches reconnues par la sonde testée.



**Figure 12 :** Analyse par Southern blot avec la sonde ORF16 des 33 souches de la collection de *M.agalactiae*.

Ce Southern blot est réalisé avec l'ADN génomique de 33 souches de *M.agalactiae* et la souche type PG45 de *M.bovis* digérées par l'enzyme de restriction *EcoRI* (Cf. Matériels et méthodes). La sonde ORF16 s'est hybridée avec les souches 3990, 5632 et 8064 de *M.agalactiae* et la souche type PG45 de *M.bovis* pour lesquelles une seule bande est reconnue.



**Figure 13 :** Analyse par Southern blot avec la sonde ORF16 des 57 souches de *M.bovis*

Ce Southern blot est réalisé avec l'ADN génomique de 57 souches de *M.bovis* et 19 souches de *M.agalactiae* digérées par l'enzyme de restriction *EcoRI* (Cf. Matériels et méthodes). La sonde ORF16 s'est hybridée avec 40 souches de *M.bovis* dont la souche type PG45 et les souches 5632 et 8064 de *M.agalactiae*. Pour chaque souche une seule bande est identifiée sauf pour la souche 4235 où deux bandes sont présentes. (Pour les souches 9591, 9583 et 6692, les signaux émis sont trop forts et ils ne permettent pas de voir s'il y a une ou deux bandes).

Dans la collection *M.agalactiae* 3 souches sont reconnues par toutes les sondes : 3990, 5632 et 8064 ainsi que le contrôle positif la souche type PG45 de *M.bovis* (Tableau 5). Pour les souches 3990 et 5632 une seule bande est révélée. La taille des fragments *EcoRI* reconnus par les différentes sondes pour les souches 3990 et 5632 est conforme à ce que l'on peut attendre d'après les séquences clonées séquencées. En effet, les sondes A, B, E73, ORF7, ORF15 et ORF16 reconnaissent le même fragment *EcoRI* de 7,2 kb dont la taille est inférieure aux fragments *EcoRI* reconnus par les sondes ORF19, C48, C38 et D de 8,3 kb.

Pour la souche 8064 de *M.agalactiae*, les sondes correspondant à la séquence clonée 703 (à savoir les sondes A, B, E73, ORF7, ORF15, ORF16 et C) reconnaissent les deux mêmes bandes (Tableau 5). Les sondes correspondant à la séquence clonée 707 (à savoir les sondes C48, ORF19, C38 et D) donnent des profils de bandes différents. La sonde C48 et la sonde ORF19 reconnaissent les mêmes bandes. La bande de forte intensité reconnue par les sondes C48 et ORF19 est de plus petite taille que celle reconnue par les sondes C38 et D. Un site *EcoRI* supplémentaire existe donc probablement pour la souche 8064 par rapport à la souche 5632. Ce site serait situé entre les séquences reconnues par les sondes ORF19 et C38.

La sonde D reconnaît de nombreuses souches (28) dont la 3990, la 5632 et la 8064 avec une forte intensité. Les 25 souches restantes dont la souche type PG2 sont reconnues mais avec une très faible intensité.

La collection *M.agalactiae* des Pays Basques a été testée avec les sondes E73, C38 et C48 mais aucune souche ne s'est hybridée avec ces sondes alors que le contrôle positif (la souche type PG45 de *M.bovis*) présent sur ces blots s'est hybridé. Sur cette membrane était aussi présente la souche C44/82 de *M.fermentans* qui ne s'est pas hybridée avec les sondes testées.

Dans la collection *M.bovis*, 38 souches se sont hybridées avec l'ensemble des sondes testées sauf la sonde D qui ne reconnaît aucune des souches de cette collection (Tableau 6). En plus de ces 38 souches, la souche 12670 s'est hybridée avec toutes les sondes sauf les sondes A, D, ORF7 et ORF15 et la souche 6743 s'est hybridée avec l'ensemble des sondes sauf les sondes ORF7 et D. Pour cette souche l'ensemble des bandes reconnues par les sondes est de faible intensité comme c'est aussi le cas pour la souche 10807. Pour les souches 4235, 6692, 9583 et 9591 deux bandes de forte intensité sont observées avec les sondes correspondant à la séquence clonée 703 (à savoir les sondes A, B, E73, ORF7, ORF15, ORF16 et C) ce qui n'est pas le cas des sondes correspondant à la séquence clonée 707 (à savoir les sondes C38, C48, ORF19 et D) où on a une seule bande de forte intensité. Cependant, avec la sonde E73 une seule bande est reconnue pour les souches 6692, 9583 et 9591 (Tableau 6). Pour ces mêmes souches, la présence de 2 bandes n'a pas pu être

déterminée pour la sonde ORF16 à cause de la forte intensité des bandes reconnues. La superposition des membranes issues de la même migration montre que les bandes reconnues par les différentes sondes sont identiques aussi bien pour les sondes correspondant à la séquence clonée 703 que pour les sondes issues de la séquence clonée 707. Les fragments reconnus par l'ensemble des sondes ont donc pour une souche donnée la même taille.

#### **2.4- Etude des sites de restriction de l'ICE chez la souche 5632 de *M.agalactiae*:**

Pour cette étude des digestions simples et doubles par diverses enzymes de restriction de l'ADN génomique de la souche 5632 ont été réalisées, puis analysées par Southern blot. Les enzymes de restriction ont été choisies en fonction de la carte de restriction des séquences 703 et 707 clonées (Figure 11). Des enzymes coupant peu et moyennement l'ADN ont été choisies pour les simples digestions. L'enzyme *Bam*HI qui coupe très peu l'ADN a été choisie car ce site était présent dans l'ICE. Nous espérons que si une forme circulaire de l'ICE existait dans la souche 5632 elle serait digérée sur le site de coupure *Bam*HI et qu'une bande de faible intensité et de relativement faible taille serait reconnue par les sondes utilisées. Pour les doubles digestions des enzymes donnant de grands fragments ont été choisies pour étudier uniquement la souche 5632. Le but était de savoir quelle était l'organisation des sites de restriction en dehors des sites *Eco*RI de la souche 5632 en prévision du clonage de ces fragments pour étudier les limites de cet ICE. Nous n'avons pas réalisé de double digestion des souches 8064 et 3990 car nous ne connaissions pas les séquences de l'ICE et donc la position des sites de restriction dans ces souches. Le but de cette partie étant de proposer une carte physique de l'ICE de part et d'autre des sites de restriction *Eco*RI, des sondes proches des extrémités ont été choisies. D'autre part, les sondes plus internes à l'ICE ont été choisies pour confirmer la carte de restriction déduite des séquences clonées 703 et 707 dans la souche 5632 de *M.agalactiae*. Ainsi, trois sondes (A, B et E73) correspondant à la séquence clonée 703 et quatre sondes (C48, ORF19, C38 et D) correspondant à la séquence clonée 707 ont été utilisées.

| Sondes<br>utilisées | Enzymes de restriction <sup>a</sup> |                    |                          |                    |                                 |                    |                   |                    |                          |                    |                     |                    |                      |                     |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
|                     | <i>EcoRI</i>                        |                    | <i>XbaI</i> <sup>b</sup> |                    | <i>PstI</i>                     |                    | <i>BamHI</i>      |                    | <i>ClaI</i> <sup>c</sup> |                    | <i>EcoRV</i>        |                    | <i>HindIII</i>       |                     |
|                     | Taille<br>estimée                   | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée        | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée               | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée        | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée   | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée    | Taille<br>attendue  |
| Sonde A             | 7                                   | 7,2                | 9,4 / 7,3 /<br>7         | > 1                | 23 / 15 /<br>14 <sup>(22)</sup> | > 6,8              | 23                | > 11,8             | 23 / 22                  | > 10,1             | 3 <sup>(4)</sup>    | > 1,1              | 2,5 <sup>(2,7)</sup> | > 1,9               |
| Sonde B             | 7                                   | 7,2                | 15                       | 9,3                | 23 / 15 /<br>14 <sup>(22)</sup> | > 6,8              | 23                | > 11,8             | 23 / 22                  | > 10,1             | 1 <sup>(4)(3)</sup> | 1                  | 2,5                  | > 1,9               |
| Sonde E73           | 7                                   | 7,2                | 15                       | 9,3                | 23 / 15 /<br>14 <sup>(22)</sup> | > 6,8              | 23                | > 11,8             | 23 / 22                  | > 10,1             | 4                   | 4                  | 700                  | 0,01 / 0,7<br>/ 0,9 |
| Sonde C48           | 8                                   | 8,3                | 15                       | 9,3                | 22 / 22,5                       | > 8,7              | 23                | > 11,8             | 23 / 22                  | > 10,1             | 3,5 / 5             | 3,5                | 4 / 2                | 0,02 / 2 /<br>3,8   |
| Sonde 19            | 8                                   | 8,3                | 15                       | > 5,1 /<br>9,3     | 22 / 22,5                       | > 8,7              | 23                | > 11,8             | 19 / 18 /<br>14          | 2,6 /<br>> 10,1    | 3,5 / 5             | 3,5                | 1,9                  | 2                   |
| Sonde C38           | 8                                   | 8,3                | 15                       | > 5,1              | 22 / 22,5                       | > 8,7              | 23                | > 3,7              | 19 / 18 /<br>14          | 2,6                | 1,1 <sup>(5)</sup>  | 3,5 / 1,1          | 1,1 <sup>(3,5)</sup> | 1,1                 |
| Sonde D             | 8                                   | 8,3                | 15                       | > 5,1              | 22 / 22,5                       | > 8,7              | 23                | > 3,7              | 19 / 18 /<br>14          | > 2,8              | 9,5 <sup>(3)</sup>  | > 2,8              | 1,9 <sup>(3,5)</sup> | > 0,4               |

<sup>a</sup> La position des différents sites de restriction est représentée à la figure 11

<sup>b</sup> Le site de restriction *XbaI* situé à 10,3 kb est méthylé chez la souche 5632 de *M.agalactiae*

<sup>c</sup> Le site de restriction *ClaI* situé à 12,6 kb est présent sur la séquence d'ADN clonée mais absent de l'ADN génomique de la souche 5632 de *M.agalactiae*  
Les nombres de petite taille et entre parenthèse correspondent à des bandes de faible intensité

**Tableau 7** : Comparaison entre les tailles attendues (en kb) et estimées (en kb) des fragments de restriction de la souche 5632 de *M.agalactiae* reconnus par différentes sondes. (Cf. texte pour les détails)

**Enzymes de restriction<sup>a</sup>**

| Sondes<br>utilisées | <i>XbaI<sup>b</sup>-PstI</i> |                    | <i>XbaI<sup>b</sup>-ClaI<sup>c</sup></i> |                    | <i>ClaI<sup>c</sup>-PstI</i> |                    | <i>BamHI- ClaI<sup>c</sup></i> |                    | <i>BamHI- PstI</i> |                    | <i>BamHI-XbaI<sup>b</sup></i> |                    |
|---------------------|------------------------------|--------------------|--|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
|                     | Taille<br>estimée            | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée                        | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée            | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée              | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée  | Taille<br>attendue | Taille<br>estimée             | Taille<br>attendue |
| Sonde A             | 9,4 / 7,3 / 7                | > 1                | 9,4 / 7,3 / 7                            | > 1                | 20 / 15 / 14                 | 6,8                | 23 / 22                        | > 10,1             | 23 / 15 / 14       | > 6,8              | 9,4 / 7,3 / 7                 | >1                 |
| Sonde C38           | 9                            | > 5,1              | 6  | 2,3                | 18 / 14                      | 2,6                | 1,7                            | 1,7                | 5                  | 5                  | 10                            | 1,5                |
| Sonde D             | 9                            | > 5,1              | 6  | > 2,8              | 18 / 14                      | > 2,8              | 19 / 18 / 14                   | > 3,7              | 20 / 17            | > 3,7              | 4,2                           | < 3,7              |

<sup>a</sup> La position des différents sites de restriction est représentée à la figure 11

<sup>b</sup> Le site de restriction *XbaI* situé à 10,3 kb est méthylé chez la souche 5632 de *M.agalactiae*

<sup>c</sup> Le site de restriction *ClaI* situé à 12,6 kb est présent sur la séquence d'ADN clonée mais absent de l'ADN génomique de la souche 5632 de *M.agalactiae*

**Tableau 8 :** Comparaison entre les tailles attendues (en kb) et estimées (en kb) des fragments de restriction issus des doubles digestions de la souche 5632 de *M.agalactiae* et reconnus par différentes sondes.

### 2.4.1- Confirmation de la présence des sites de restriction dans le génome de la souche 5632 :

Les hybridations des simples digestions de la souche 5632 de *M.agalactiae* avec les sondes internes à l'ICE (Tableau 7) montrent pour les enzymes de restriction *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* et *HindIII* des bandes de forte intensité de taille attendue d'après la carte de restriction des séquences clonées. Pour l'enzyme *EcoRV* avec les sondes C48 et ORF19 deux bandes de 3,5 et 5 kb sont observées alors que qu'une bande de 3,5 kb devrait être obtenue. La bande supplémentaire à 5 kb correspond probablement à une digestion partielle de l'ADN génomique de la souche 5632 de *M.agalactiae* (Tableau 7 et Figure 11).

Avec l'enzyme de restriction *XbaI*, on obtient 1 seule bande de 15 kb avec toutes les sondes testées sauf la sonde A (Tableau 7). Le site de restriction *XbaI* (5'-TCTAGA-3') présent à la position 10340 pdb sur la séquence d'ADN clonée 707 forme avec les deux nucléotides suivants en 3' (5'-TC-3') un motif GATC. La souche 5632 est connue pour posséder un système enzymatique de méthylation reconnaissant ce motif, probablement sur le résidu A de GATC. La méthylation de cette séquence empêche la digestion du site de restriction par *XbaI* ce qui explique l'obtention d'une seule et unique bande de 15 kb comme si le site *XbaI* à 10340 pdb n'existait pas (Tableau 7). La double digestion *BamHI/XbaI* confirme la méthylation de ce site car une bande de 10 kb est alors observée avec la sonde C38 (Tableau 8) témoignant d'une digestion entre le site *XbaI* à 1043 pdb sur la séquence 703 et *BamHI* à 11803 pdb sur la séquence 707. La différence entre ces deux positions est égale à 10,7 kb proche de la taille observée.

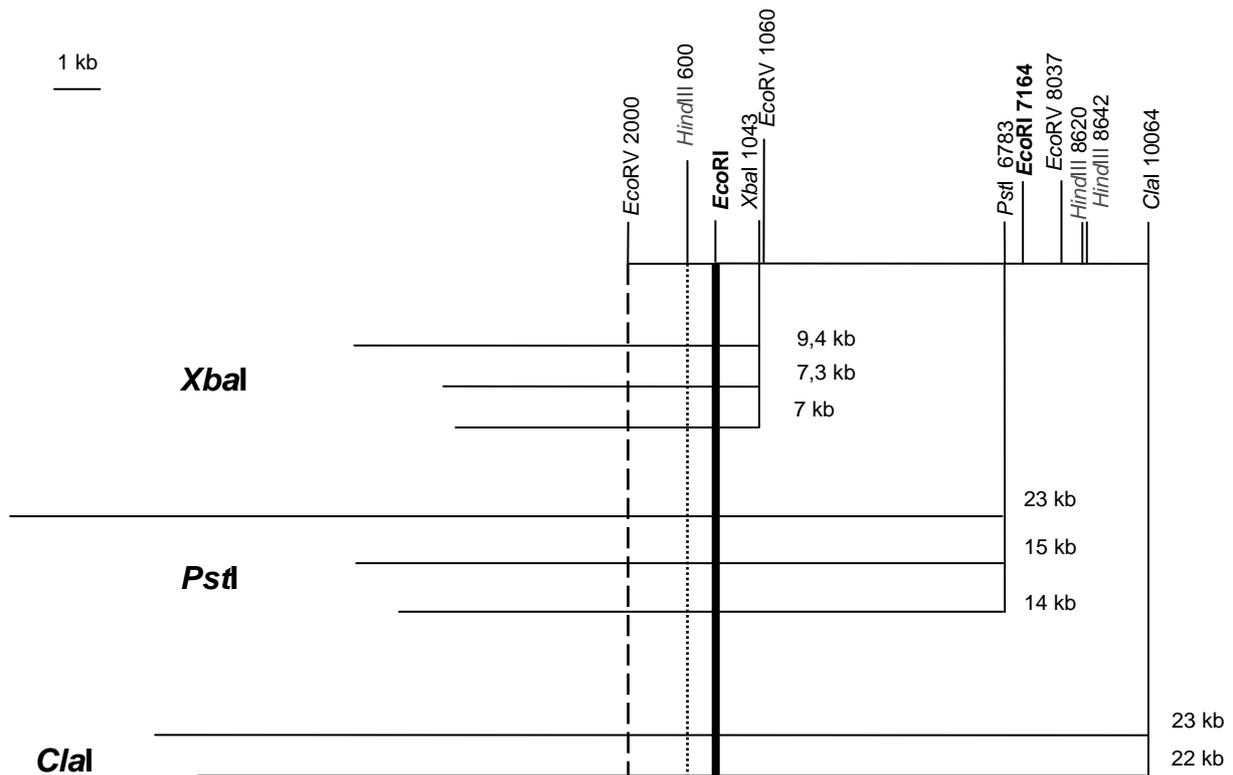
Avec l'enzyme de restriction *ClaI*, les sondes situées en 3' du site de restriction *ClaI* à 10064 pdb reconnaissent trois bandes pour chaque sonde. D'après la carte de restriction obtenue après le séquençage des séquences 703 et 707 un site *ClaI* est présent à 12617 pdb donc les sondes ORF19 et C38, qui hybrident avec les séquences situées entre le site de restriction *ClaI* à 10064 pdb et le site à 12617 pdb devraient mettre en évidence une bande à 2,6 kb, ce qui n'est pas le cas. En effet, trois bandes dont la taille est différente de 2,6 kb sont observées, comme si le site de restriction *ClaI* à la position 12617 pdb de la séquence 707 n'existait pas (Tableau 7). Ce résultat est confirmé par la double digestion *PstI/ClaI* où la sonde C38 devrait reconnaître une bande de 2,6 kb alors qu'elle reconnaît deux bandes de 18 et 15 kb (Tableau 8). A l'inverse du précédent, ce résultat ne s'explique pas par la méthylation de l'ADN génomique sur un motif GATC chevauchant le site *ClaI*, car la séquence adjacente à ce dernier est incompatible avec une telle situation. Donc l'hybridation des simples digestions confirme l'absence dans le génome de la souche 5632 du site *ClaI* à 12617 pdb et la

méthylation du site de restriction *XbaI* à 10340 pdb. Cependant, ces sites existent dans la séquence clonée 707 car la digestion par ces mêmes enzymes d'une préparation des plasmides 703 et 707 à partir d'une souche d'*E.coli* non méthylante en GATC donne des fragments de taille attendue.

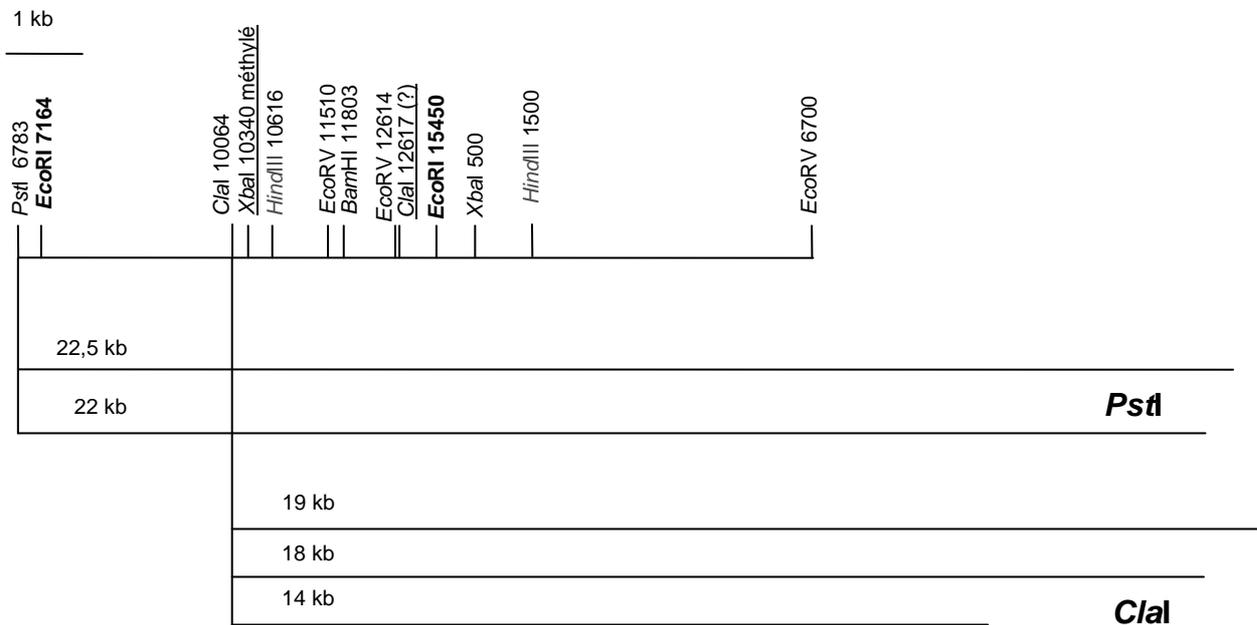
#### **2.4.2- Organisation des sites de restriction de l'ICE en dehors des sites *EcoRI* :**

L'hybridation de la digestion par l'enzyme de restriction *EcoRV* avec la sonde A révèle une bande de 3 kb (Tableau 7). Ainsi, un site *EcoRV* est présent à environ 2 kb du site *EcoRI* du côté 5' de l'ADN génomique de la souche 5632. Du côté 3', on obtient avec la sonde D pour la même enzyme une seule bande de 9,5 kb. Ainsi, du côté 3' un site *EcoRV* est situé à environ 6,7 kb du site *EcoRI*. Avec l'enzyme de restriction *HindIII*, la sonde A révèle une seule bande de 2,5 kb ce qui prouve qu'un site *HindIII* est présent à environ 600 pdb du site *EcoRI* du côté 5'. Du côté 3' pour la sonde D et la même enzyme de restriction on obtient une seule bande d'environ 1,9 kb ce qui prouve qu'un site *HindIII* est présent à environ 1,5 kb du site *EcoRI*. Toujours du côté 3' on a aussi un site *XbaI* situé à environ 500 pdb du site *EcoRI* d'après la taille de la bande unique (15 kb) obtenue avec les sondes testées. Ainsi, du côté 5' de l'ICE de la souche 5632 un site *EcoRV* puis un site *HindIII* sont prédits en amont du site *EcoRI* et du côté 3' un site *XbaI* puis *HindIII* puis *EcoRV* sont prédits en aval du site *EcoRI* (Figures 14 et 15).

Avec l'enzyme de restriction *PstI* les sondes correspondant aux séquences situées en amont du site de restriction *PstI* à 6783 pdb révèlent trois bandes de forte intensité et une de faible intensité (Tableau 7). Pour chaque sonde située en aval de ce site de restriction *PstI* les deux mêmes bandes de forte intensité sont observées (Tableau 7 et Figure 16). Pour l'enzyme *ClaI* les sondes correspondant aux séquences situées en amont du site de restriction *ClaI* à 10064 pdb révèlent deux bandes de forte intensité et pour les sondes situées en aval de ce site trois bandes de forte intensité sont obtenues (Figure 16). Avec l'enzyme *XbaI*, les sondes situées en amont du site de restriction *XbaI* révèlent trois bandes de forte intensité. Ainsi, du côté 5', 3 bandes sont mises en évidence avec les enzymes de restriction *XbaI* et *PstI* et deux bandes avec l'enzyme de restriction *ClaI*. Du côté 3', deux bandes sont mises en évidence avec l'enzyme de restriction *PstI* et trois avec l'enzyme *ClaI* (Figures 14 et 15). La variation du nombre de bandes obtenues s'explique par la taille importante des fragments de restriction. Lorsque la taille des fragments de restriction est supérieure à 22 kb, la migration sur gel d'agarose de l'ADN est insuffisante pour permettre leur séparation et leur distinction grâce au



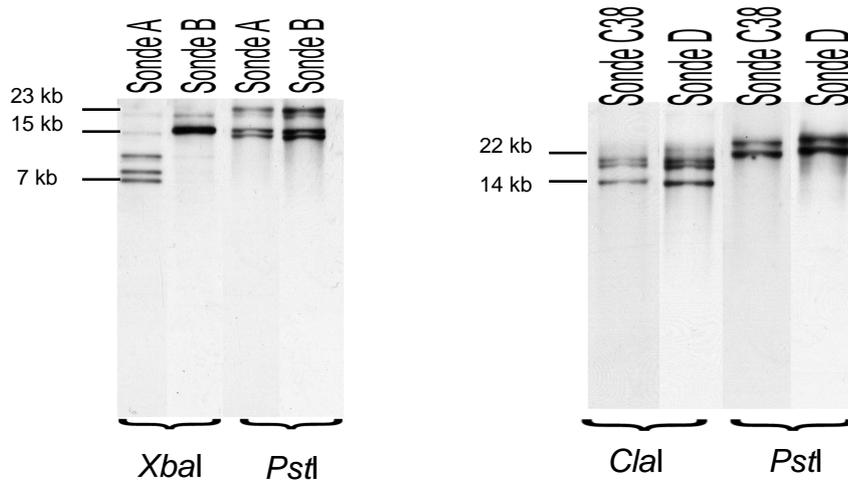
**Figure 14** : Représentation de la position (pdb) des sites de restriction à l'extrémité 5' de l'ICE de la souche 5632 de *M.agalactiae*



**Figure 15** : Représentation de la position (pdb) des sites de restriction à l'extrémité 3' de l'ICE de la souche 5632 de *M.agalactiae*.

Southern. Les bandes de taille supérieure à 22 kb supposées reconnues par les sondes peuvent donc être confondues. C'est pourquoi nous avons considéré que le nombre de bandes devait être de trois pour les régions flanquantes des séquences 703 et 707.

Pour les doubles digestions (Tableau 8), seules les sondes A, C38 et D, proches des extrémités ont été utilisées pour confirmer l'organisation mise en évidence avec les simples digestions. Les doubles digestions hybridées avec la sonde A confirment l'organisation de la souche 5632 du côté 5' (Figure 14 et Tableau 8). Cependant, avec les sondes C38 et D certains résultats ne sont pas cohérents avec ceux obtenus avec les simples digestions. La double digestion *PstI/ClaI* devrait nous donner avec les sondes C38 et D, 3 bandes alors que nous n'obtenons que 2 bandes. Avec la sonde D, les tailles estimées des bandes pour les doubles digestions *BamHI/ClaI* et *BamHI/PstI* sont légèrement différentes des tailles attendues d'après l'organisation suggérée par les simples digestions. La double digestion *BamHI/ClaI* hybridée avec la sonde D donne 3 bandes qui devraient être de 17,3, 16,3 et 12,3 kb alors que nous obtenons 3 bandes de 19, 18 et 14 kb. La double digestion *BamHI/PstI* donne 2 bandes qui devraient être de 17 et 17,5 kb. Avec la sonde D, pour cette double digestion est obtenue une bande de taille attendue celle de 17 kb et une deuxième bande de 20 kb (Tableau 8).



**Figure 16 :** Illustration de l'analyse par Southern blot des simples digestions de la souche 5632 de *M.agalactiae* avec les sondes A, B, C38 et D.

L'ADN de la souche 5632 de *M.agalactiae* a été digéré par les enzymes de restriction *XbaI*, *PstI* et *ClaI*. Ces ADN digérés ont été transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec les sondes A et B pour l'analyse des régions flanquantes de la séquence 703 et les sondes C38 et D pour l'analyse des régions flanquantes de la séquence 707. Cette analyse par Southern des fragments de restriction portant les régions flanquantes aux extrémités séquencées de l'ICE de la souche 5632 indique la présence d'au moins trois copies de l'ICE pour la souche 5632 de *M.agalactiae*.

| Sondes utilisées | Enzymes de restriction |             |             |              |             |              |                |
|------------------|------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|----------------|
|                  | <i>EcoRI</i>           | <i>XbaI</i> | <i>PstI</i> | <i>BamHI</i> | <i>ClaI</i> | <i>EcoRV</i> | <i>HindIII</i> |
| Sonde A          | 7                      | 15          | 15          | 23           | 23          | 4            | 2,5            |
| Sonde B          | 7                      | 15          | 15          | 23           | 23          | 4            | 2,5            |
| Sonde E73        | 7                      | 15          | 15          | 23           | 23          | 4            | -              |
| Sonde C48        | 10                     | 15          | 22          | 23           | 20          | 10           | 4              |
| Sonde 19         | 10                     | 5,5         | 22          | 23           | 20          | 10           | 1              |
| Sonde C38        | 10                     | 5,5         | 22          | 20           | 20          | 10           | -              |
| Sonde D          | 10                     | 1,9         | 22          | 20           | 20          | 7            | 1,4            |

**Tableau 9 :** Taille (en kb) des fragments de restriction reconnus par différentes sondes pour la souche 3990 de *M.agalactiae*

| Sondes utilisées | Enzymes de restriction    |              |             |              |             |              |                         |
|------------------|---------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|
|                  | <i>EcoRI</i> <sup>a</sup> | <i>XbaI</i>  | <i>PstI</i> | <i>BamHI</i> | <i>ClaI</i> | <i>EcoRV</i> | <i>HindIII</i>          |
| Sonde A          | 7,3                       | 21/22        | 9,6/21      | 23           | 23          | 1,6          | 4,3/4,2/2,5/2,1/1,1/0,9 |
| Sonde B          | 7,3                       | 21/22        | 9,6/21      | 23           | 23          | 9,6          | 4,3/4,2/3/2,8           |
| Sonde E73        | 7,3                       | 21/22        | 9,6/21      | 23           | 23          | 9,6          | 4,3/4,2/3/2,3/2,2/1     |
| Sonde C48        | 3,5                       | 21/22        | 13          | 23           | 23          | 9,6          | 6/4/2                   |
| Sonde 19         | 3,5                       | 21/22        | 13          | 23           | 23          | 9,6          | 6/2                     |
| Sonde C38        | 5                         | 21/22        | 13          | 23           | 23          | 9,6          | 1,1 (4,2)               |
| Sonde D          | 5                         | 21/22 (4)(5) | 13 (23)     | 23           | 23 (19)     | 9,6 (3)      | 7/6,6 (3)(1,9)          |

<sup>a</sup>Le site *EcoRI* est présent trois fois pour la souche 8064 de *M.agalactiae*

Les chiffres de petite taille et entre parenthèse correspondent à des bandes de faible intensité

**Tableau 10:** Taille (en kb) des fragments de restriction reconnus par différentes sondes pour la souche 8064 de *M.agalactiae*

## 2.5- Etude des sites de restriction de l'ICE chez les souches 3990 et 8064 de *M.agalactiae* :

L'hybridation des simples digestions de la souche 3990 de *M.agalactiae* révèle pour chaque enzyme de restriction une seule bande. Les deux fragments *EcoRI* obtenus pour la souche 3990 ont une taille estimée de 7 et 10 kb (Tableau 9). Le deuxième fragment *EcoRI* obtenu pour la souche 3990 est plus grand que la séquence 707 de la souche 5632. Les digestions de la souche 3990 par les autres enzymes de restriction (Tableau 9) révèlent la présence :

- de deux sites de restriction *XbaI* : un entre les séquences reconnues par les sondes C48 et ORF19 et l'autre entre les séquences reconnues par les sondes C38 et D.
- d'un site *PstI* entre les séquences reconnues par les sondes E73 et C48.
- d'un site *BamHI* entre les séquences reconnues par les sondes ORF19 et C38.
- d'un site *ClaI* entre les séquences reconnues par les sondes E73 et C48.
- de deux sites *EcoRV* : un entre les séquences reconnues par les sondes E73 et C48 et l'autre entre les séquences reconnues par les sondes C38 et D.
- de plusieurs sites *HindIII*.

L'hybridation des simples digestions de la souche 8064 de *M.agalactiae* révèle une seule bande sauf avec les enzymes de restriction *XbaI*, *HindIII* et *PstI* (Tableau 10). Avec l'enzyme de restriction *XbaI*, toutes les sondes s'hybrident avec 2 bandes de 21 et 22 kb. Avec l'enzyme *PstI*, les sondes A, B et E73 s'hybrident avec deux bandes de 21 et 9,6 kb, les autres sondes s'hybrident avec une seule bande de 13 kb. Avec l'enzyme de restriction *EcoRI*, les sondes C48 et ORF19 révèlent une bande de 3,5 kb et les sondes C38 et D révèlent une bande de 5 kb ce qui confirme la présence d'un site *EcoRI* entre les séquences reconnues par les sondes ORF19 et C38. Pour les autres enzymes utilisées, l'hybridation des fragments de restriction révèle (Tableau 10) :

- plusieurs sites *HindIII*
- un site *ClaI*, un site *XbaI* et un site *BamHI*. Ces sites ne peuvent pas être situés car toutes les sondes ne reconnaissent qu'une seule bande.
- un site *PstI* situé entre les séquences reconnues par les sondes E73 et C48 ;

- un site *EcoRV* situé entre les séquences reconnues par les sondes A et B.

La position et le nombre des sites de restriction des souches 3990 et 8064 par rapport à ceux de la souche 5632 sont différents ce qui est normal car nous avons à faire à trois souches de bactéries différentes avec des séquences différentes. Cependant, l'hybridation des simples digestions des souches 3990 et 8064 de *M.agalactiae* indique que l'ordre des ORF semble conservé par rapport à celui de la souche 5632.

### 3/ Discussion :

#### 3.1- Particularités des souches de *M.agalactiae* comportant des homologies de séquences avec l'ICEF :

Parmi les souches de *M.agalactiae*, les souches 5632, 3990 et 8064 sont reconnues par l'ensemble des sondes correspondant à l'ICE de la souche 5632. Ces trois souches sont notamment caractérisées par un profil de gènes *vpma* différents de la souche type PG2 : sur les 6 gènes *vpma* que possède cette dernière, la souche 5632 possède deux gènes en commun. La souche 3990 possède un gène *vpma* en commun et la 8064 trois gènes en commun. De plus, les souches 5632, 3990 et 8064 de *M.agalactiae* ne réagissent pas avec l'anticorps monoclonal 1D4, les souches 5632 et 3990 ne réagissent pas avec l'anticorps monoclonal SA1 alors que la souche 8064 réagit. Les souches 8064 et 5632 réagissent avec l'anticorps monoclonal 2B12 alors que la souche 3990 ne réagit pas. Ces différentes réactions signent l'appartenance de la souche 5632 au sérotype F, de la souche 8064 au sérotype E et la souche 3990 au sérotype H [5], ce qui correspond à des souches rarement isolées sur le terrain. La souche type PG2 de *M.agalactiae* appartient au sérotype A. En fait, diverses études sur des isolats de *M.agalactiae* basées sur les gènes codant pour l'ARNr 16S [3] et sur le résultat de l'hybridation des sondes synthétisées suite à l'HSS entre une souche hypovirulente et la souche type PG2 [10] ont suggéré l'existence de 2 grands groupes de souches, l'un étant "proche" de la PG2 et l'autre plus divergent. Les souches reconnues par les sondes correspondant à l'ICE de la souche 5632 semblent être génétiquement et antigéniquement différentes de la souche type PG2, ce qui peut expliquer pourquoi PG2 et toutes les souches qui lui sont "proches" ne sont pas reconnues par ces sondes. Toutefois, plusieurs souches appartenant au même groupe que les souches 5632, 3990 et 8064 ne sont pas reconnues par les sondes correspondant à l'ICE de la souche 5632. Il est important de noter que ces sondes ne reconnaissent que des parties de séquences des différents ORF de l'ICE de la souche 5632 donc ce n'est pas parce que ces sondes ne s'hybrident pas avec l'ADN d'une souche qu'un ICE est absent de cette souche. De plus, même dans les conditions les moins stringentes, les sondes ne s'hybrident que s'il existe plus de 80 % d'identité entre la séquence de la sonde et la séquence cible dans le génome étudié donc si les séquences sont divergentes la sonde ne s'hybridera pas alors que la séquence-cible génomique peut présenter une homologie avec la sonde.

Les souches 5632 et 3990 de *M.agalactiae* présentent plusieurs copies de l'*ISMag1* appartenant à la famille des séquences d'insertion IS30. En ce qui concerne la souche 8064, aucune amplification n'est obtenue avec une PCR spécifique pour cette IS mais un faible signal est détecté en Southern avec une sonde correspondant à *ISMag1* ce qui est compatible avec la présence d'une *ISMag1*-like dans cette souche [46]. Les bornes de l'ICE de la souche 5632 de *M. agalactiae* n'ont pas été déterminées mais dans la mesure où cette souche fait l'objet d'un programme de séquençage complet du génome (collaboration CNS-ENVT-INRA-Université de Bordeaux) il sera intéressant lors de leur mise en évidence de voir si comme pour l'ICEF, les ICE identifiés chez les souches 5632, 3990 et 8064 de *M.agalactiae* sont insérés dans ou à proximité d'une IS telle que l'*ISMag1*. Il faut toutefois noter que ces IS, dans lesquelles sont insérées les copies de l'ICEF de *M.fermentans* appartiennent à une famille d'IS différente, à savoir la famille IS3.

Chez *M.fermentans*, Calcutt et al (2002) ont réalisé des PCR avec des amorces correspondant à la région intergénique en 5' de l'ORF1 pour rechercher les souches qui possédaient l'ICE. Les souches *incognitus*, SK6, SK5, M70B, M39B, MT-2, K7 et II-29/1 de *M.fermentans* ont été testées avec ces amorces et seules les souches SK6, SK5, M70B, M39B présentent un amplifiat de taille attendue. L'analyse de ces amplifiats révèle que chez ces souches l'ICEF est intégré dans des sites très variables. Dans notre étude, l'ADN de la souche C44/82 de *M.fermentans*, ne s'est pas hybridé avec les sondes testées; il faut toutefois noter que ces sondes correspondent à des séquences de la souche 5632 de *M.agalactiae*. L'absence d'hybridation entre ces sondes et la souche C44/82 de *M. fermentans* peut être due à l'absence de l'ICE dans cette souche ou à une trop grande divergence de séquences entre l'ICE de *M.fermentans* et celle de la souche 5632 de *M. agalactiae*. Par rapport à notre travail sur *M.agalactiae*, Calcutt et al (2002) ont testé beaucoup moins de souches mais cette étude nous montre que chez une même espèce de mycoplasmes toutes les souches ne possèdent pas obligatoirement l'ICE. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre le lien éventuel entre le pouvoir pathogène des souches de *M.agalactiae* avec ICE par rapport au pouvoir pathogène des souches qui ne le possèdent pas. Calcutt et al, ont montré que les souches sans ICE étaient des souches de contamination des milieux de culture cellulaire et ils proposent que l'acquisition de l'ICEF pourrait se produire pendant l'infection chez l'homme et permettrait l'adaptation de *M.fermentans* à son hôte. D'autres rôles, pour d'autres ICE ont été mis en évidence tels que la résistance aux antibiotiques, l'intervention dans des voies métaboliques, et dans la synthèse de facteurs de virulence (Tableau 4). Mais il reste encore de nombreux ICE dont le rôle n'a pas été déterminé.

Les simples et doubles digestions suggèrent que certaines souches possèdent plusieurs copies de l'ICE. L'analyse par Southern des fragments de restriction portant les régions flanquantes aux extrémités séquencées de l'ICE de la souche 5632 (ORFA et ORFD) semble indiquer la présence d'au moins trois copies de l'ICE pour la souche 5632 de *M.agalactiae*. D'après cette même analyse la souche 3990 de *M.agalactiae* semble posséder une seule copie et la souche 8064 2 copies de l'ICE. La possible mise en évidence de plusieurs copies d'ICE n'est pas surprenante car pour la souche PG18 de *M.fermentans*, il existe quatre copies de l'ICEF [17]. La présence de plusieurs copies d'un même ICE semble jouer un rôle sur la fréquence d'excision de ces éléments et il est possible que les différents éléments puissent interagir entre eux [30]. Il reste encore de nombreux points à éclaircir concernant les ICE que nous avons découvert et leur rôle chez *M.agalactiae* et *M.bovis*. Pourquoi la souche 5632 posséderait trois copies, la souche 3990 une seule et la souche 8064 2 copies ? Il est possible qu'au cours de l'évolution certaines souches proviennent d'une cellule qui a perdu des copies (ex : 3990) ou qui en a acquis (ex : 5632) ; il est également possible que la présence de plusieurs copies d'ICE soit due à des phénomènes de duplications pouvant se produire sur certaines régions du chromosome, notamment lors de la réplication.

### **3.2- Particularités des souches de *M.bovis* comportant des homologies de séquences avec l'ICEF :**

Sur les 40 souches de *M.bovis* possédant l'ICE 18 souches sur 24 ont été isolées en France, 8 souches sur 10 en Espagne et 6 souches sur 7 en Suisse. En ce qui concerne la localisation des isolements, 12 souches avec ICE sur 14 sont isolées dans le lait et 18 souches sur 26 sont isolées à partir de poumon. Les trois pays où ces bactéries ont été isolées ont une frontière commune.

L'analyse par Southern chez *M.bovis* montre qu'il existe deux souches (6743 et 12670) pour lesquelles la sonde correspondant à l'ORF7 ne s'hybride pas. Vu l'intensité des réactions des autres sondes obtenues avec les mêmes conditions de lavage et de température d'hybridation nous avons considéré que la séquence-cible était absente ou significativement divergente de la sonde. Il s'agit de l'ORF7 dont le produit code pour une protéine membranaire chez *M.fermentans*. Pour la souche 12670 de *M.bovis*, en plus de l'ORF7 il manque aussi l'ORFA et l'ORF15 dont le produit est aussi une protéine avec un motif de protéine membranaire. Le rôle de ces protéines n'est pas connu. Ces ORF ont peut être, chez ces deux souches de *M.bovis*, été perdus au cours de leur transfert ou de l'évolution du

génomique des bactéries qui les portent. Cependant, la majorité des souches testées porte les ORF7 et 15 ce qui suggère que cet événement est relativement rare.

Les souches 4235, 6692, 9583 et 9591 de *M.bovis* montrent la présence de deux bandes *EcoRI* avec les sondes issues de la séquence 703 mais qu'une seule bande *EcoRI* avec les sondes issues de la séquence 707. Ce résultat suggère la présence de deux copies au moins pour la partie portant les ORF de la séquence 703. Parmi ces quatre souches, les souches 6692, 9583 et 9591 présentent une seule bande *EcoRI* avec la sonde E73. La sonde E73 correspond à une partie de la séquence de l'ORF5 dont le produit est homologue à des protéines impliquées dans la mobilité de l'ADN. Ainsi, pour quatre souches de *M.bovis*, une copie complète et une copie tronquée de l'ICE semblent être présentes. La copie tronquée possède tous les ORF sauf ceux dont les produits présentent une homologie avec des protéines impliquées dans le transfert de gènes. Il est possible qu'une des deux copies ait perdu ces capacités de transfert par perte des modules impliqués dans leur dissémination. Mais, il est aussi possible qu'elle ait subi des réarrangements avec d'autres modules et que les capacités de transfert soient assurées par d'autres gènes de nature différente. Calcutt et al (2002) ont démontré pour leur ICEF deux types de configuration, et les comparaisons entre des transposons conjugatifs ont montré que les modules pouvaient se perdre, s'échanger et se modifier au cours de l'évolution [65].

Lors d'infection à *M.bovis*, on a souvent des co-infections avec isolement de *M.bovis* et/ou *Pasteurella multocida* et/ou *Haemophilus somnus* [44]. Bien qu'aucun ICE ne soit encore décrit chez ces deux espèces, il serait intéressant de les rechercher. Il faut noter qu'un ICE appelé P1056 portant des gènes de résistance à la tétracycline et à l'ampicilline ont été découverts chez *Haemophilus influenzae* [15]. Il semble que pour des bactéries tels que les lactobacilles utilisées dans les processus de fermentation des fromages de tels échanges aient été constatés. Des IS, certains gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides et des systèmes de restriction modification ont été transférés entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus lactis* lors de co-cultures pendant la fabrication de fromages [13].

### 3.3-Comparaison des caractéristiques des souches comportant l'ICE de *M.bovis* et de *M.agalactiae* :

Cet ICE est donc retrouvé dans de nombreuses souches de la collection *M.bovis* et quelques souches de la collection *M.agalactiae* où pour chaque collection les souches sont représentatives des lieux et des années d'isolement. Il est intéressant de noter qu'au sein de chaque collection, deux groupes se détachent clairement : les souches avec ICE de celles sans ICE. Cette observation est compatible avec l'hypothèse d'un élément transmissible qui passerait d'une cellule donneuse à une receveuse à la faveur de co-infections, générant quelques populations porteuses de l'ICE, et laissant d'autres dépourvues de cet élément. Mais il est également possible que l'absence d'ICE dans certaines souches soit due à la perte de ces éléments au cours de l'évolution.

Les souches de *M.agalactiae* et de *M.bovis* qui possèdent l'ICE réagissent très fortement avec les sondes correspondant à l'ICE de la souche 5632 ce qui témoigne d'une parenté entre ces souches. D'ailleurs, la sonde E73 issue de la souche type PG45 de *M.bovis* présente 92 % d'homologie sur les 431 pnb qui correspondent à une partie de la séquence de l'ORF5 de la souche 5632. Il est possible d'envisager pour les parties d'ICE mises en évidence chez *M.bovis* et *M.agalactiae* un lien de parenté avec un ancêtre commun.

Il est possible que géographiquement une cellule appartenant à une des souches de *M.bovis* ait échangé un élément génétique avec une cellule appartenant à une des souches de *M.agalactiae* pour donner une nouvelle population. Mais, il existe des éléments proches portés par des bactéries isolées dans des pays éloignés. C'est le cas de l'élément R391 de *Providencia rettgeri* isolé en Afrique du Sud qui est proche de l'élément SXT de *V.cholerae* isolé au Bangladesh [31]. Pour ce qui est du site d'isolement des souches une grande proportion de *M.bovis* est retrouvée au niveau pulmonaire mais aussi mammaire. En ce qui concerne, les souches de *M.agalactiae*, les bactéries ont été isolées au niveau articulaire et pulmonaire. L'échange de matériel génétique entre des cellules d'espèce différentes aurait-il pu modifier le pouvoir pathogène et la cible de ces souches ? Notamment, il est intéressant de remarquer que certains produits d'ORF de l'ICE identifié chez la souche 5632 possèdent des motifs de lipoprotéines dont le rôle est inconnu. De telles propriétés ont déjà été démontrées pour d'autres protéines associées à la membrane, comme la lipoprotéine putative P40 de *M.agalactiae* qui permet l'adhésion aux cellules de la membrane synoviale de moutons [26].

Le nombre de souches de *M.bovis* possédant l'ICE est nettement supérieur au nombre de souches de *M.agalactiae* possédant l'ICE. La présence d'éléments génétiques mobiles homologues entre deux espèces de mycoplasmes phylogénétiquement proches peut témoigner

de la présence de cet élément chez un ancêtre commun et de son évolution en fonction de l'environnement auquel ces souches furent confrontées. Mais des transmissions horizontales entre ces deux espèces et une évolution de ces ICE à partir d'un ancêtre commun sont deux mécanismes qui peuvent avoir coexisté. Cependant, par rapport à l'ICEF de *M.fermentans* des séquences supplémentaires A, B, C et D sont présentes chez *M.agalactiae* et *M.bovis* et les séquences ORF8 à ORF14 sont absentes de la souche 5632 de *M.agalactiae* (en ce qui concerne ces ORF on ne sait pas s'ils sont absents ou présents dans les souches de *M.bovis* car nous ne connaissons pas l'organisation exacte de l'ICE chez ces espèces). Les ICE de *M.fermentans* par rapport à ceux de *M.bovis* et de *M.agalactiae* ont certainement évolué de manière différente à partir d'un même ancêtre commun. Le spectre d'hôte de ces germes est très différent : ruminant pour *M.bovis* et *M.agalactiae* et humain pour *M.fermentans*. L'échange de matériel génétique entre ces espèces semble difficile mais peut être pas impossible.

### **3.4- Caractéristiques des souches présentant la séquence D :**

Les souches de *M.agalactiae* qui possèdent la séquence reconnue par la sonde D n'ont pas de caractéristiques particulières par rapport à leur pays d'isolement ou le site de prélèvement. Cette séquence est très représentée au sein de la collection *M.agalactiae* mais elle est absente de la collection *M.bovis*. Le rôle de cette protéine n'est pas connu mais rien n'empêche de penser qu'elle peut avoir un rôle dans le pouvoir pathogène ou le transfert de l'ICE. Trouver des protéines de phage dans un ICE n'est pas surprenant si on considère les nombreuses propriétés communes entre les phages et les ICE et si on considère comme possible les échanges de modules entre les phages et les éléments génétiques mobiles [65]. Chez *M.arthritidis* le phage MAFV1 est capable de s'exciser et de s'intégrer de la même manière que Tn916. Cependant, pourquoi cette séquence est présente chez de nombreuses souches de *M.agalactiae* qui ne comportent apparemment pas d'ICE ? Dans l'hypothèse où des échanges d'ICE ont pu avoir lieu entre *M.agalactiae* et *M.bovis*, pourquoi ne retrouve-t-on pas cette séquence dans le génome de *M.bovis* ? Il est possible que ces ICE aient été transférés de *M.bovis* vers *M.agalactiae* et qu'ensuite ces ICE une fois intégrés dans le génome de *M.agalactiae* aient acquis des protéines de phage.

La présence de protéines de phage à la fois chez *M.agalactiae* et *M.mycooides* subspecies *mycooides* SC peut laisser penser que ces bactéries ont eu ou ont un virus commun. Mais, pour l'instant aucun virus n'a été identifié chez aucune de ces deux espèces, et aucun ICE n'a été identifié dans le génome de *M.mycooides* subspecies *mycooides* SC. Alors quelle

peut être la relation entre l'ICE et les protéines de phage ? Mettre en évidence des protéines de phage chez deux espèces de mycoplasmes avec un spectre d'hôte et des signes cliniques différents peut laisser penser que ces séquences de phage sont des vestiges qui ne jouent plus vraiment de rôle biologique. Elle montre aussi que la présence d'éléments communs peut concerner d'autres espèces de mycoplasmes avec des spectres d'hôtes différents.

### **3.5-Limites et perspectives de notre étude :**

L'ICE identifié chez *M.agalactiae* et *M.bovis* est homologue à l'ICEF. Mais comment nommer cet ICE ? D'après la nomenclature proposée par Burrus et al on peut l'appeler ICEMa1 pour ceux découverts chez *M.agalactiae* et ICEMb1 pour ceux identifiés chez *M.bovis*. Cependant, seule l'homologie avec certains ORF de *M.fermentans* permet de parler d'ICE car contrairement à l'ICEF la présence d'une forme circulaire n'a pas été mise en évidence chez *M.bovis* et *M.agalactiae*. La présence de gènes impliqués dans le transfert et la conjugaison permet de penser que le transfert de cet élément est possible mais il n'a pas été prouvé expérimentalement pour *M.fermentans*. Nous avons essayé sans succès de mettre en évidence une forme circulaire pour l'ICEMa1 de la souche 5632 de *M.agalactiae* par la même méthode que celle qui a été employée dans l'étude de l'ICEF [17], le Tn916 d'*E.faecalis* [18], et l'élément SXT de *V.cholerae* [32] et qui repose sur la connaissance des bornes de l'ICE. L'obtention de ces bornes chez la souche 5632 de *M.agalactiae*, grâce au séquençage complet de cette souche, permettra d'obtenir de plus amples informations quant à l'organisation et la taille de notre ICE. Nous avons travaillé sur 15 kb seulement alors que l'ICEF a une taille de 23 kb, d'autres ICE ont une taille bien plus conséquente pouvant aller jusqu'à 80 kb ce qui peut expliquer pourquoi nos essais de recherche de la forme circulaire aient échoué. Une autre cause de cet échec est peut être que nos éléments ont perdu la capacité à se mettre sous forme circulaire. Il est possible que, comme Tn916 intégré dans le génome de *L.lactis*, les ICEMa1 ne puissent pas être mobilisés dans les souches de *M.agalactiae* testées. Les connaissances en terme de transfert de gènes ne sont pas complètes car par exemple en ce qui concerne les îlots de pathogénicité, bien qu'ayant des structures comparables les mécanismes de transfert semblent différents d'un îlot à l'autre et non encore élucidés pour la plupart.

Pour que la dénomination des éléments découverts soit au plus proche de la définition d'ICE, il faudrait aussi démontrer qu'ils peuvent être transférés entre espèces par un phénomène de conjugaison. Mais chez les mycoplasmes, il est très difficile de réaliser ces transferts car ils poussent lentement, et ont des conditions de culture particulière. Certains possèdent des systèmes de restriction modification détruisant l'ADN exogène et ils possèdent

un codon UGA codant pour un tryptophane qui empêche l'expression de gènes dans d'autres genres bactériens. Les transferts de gènes entre souches de *M.pulmonis* [62] et entre *E.faecalis* et *M.hominis* [54] ont été démontrés mais ils avaient une très faible fréquence. La maîtrise des conditions optimales de conjugaison chez les mycoplasmes avec mise en jeu et identification du pore, de relaxases ou d'autres éléments nécessaires à son déroulement n'a jamais été étudiée ce qui ne facilite pas non plus la réalisation expérimentale de la conjugaison.

L'excision et la circularisation de l'ICEF nécessitent une molécule spécifique mais aucun des produits des ORF ne présentait d'homologie avec une transposase connue. Les gènes qui codent pour des protéines ayant ce genre de fonction sont localisés près des sites d'action (les terminaisons de l'ICEF dans le cas présent) et les ORF1 et ORF22 sont des candidats potentiels pour avoir cette fonction. Pour nos ICE les terminaisons ne sont pas connues, donc l'absence ou la présence de ces ORF reste indéterminée. De plus, il est possible que l'ORF qui code pour la transposase n'ait pas d'homologie avec des produits d'ORF connus et que l'insertion de l'ICEF dans ou à proximité d'une IS, de même que la présence d'ICE dans des souches de *M. agalactiae* connues pour porter diverses IS ne soit pas anodine. Les ICEF pourraient utiliser les transposases des IS ce qui pourraient expliquer la duplication du site cible. De plus, il semble que les IS de la famille des IS3 soient capables de transposer des IS sous forme circulaire [41]. Les études qui consistent à comparer les différents éléments génétiques révèlent que l'intégration d'IS dans des ICE est fréquente et a des conséquences sur les fonctions de ces derniers. Cependant, cette hypothèse s'accorde mal avec le fait qu'une des copies de l'ICEF est intégrée dans le gène codant pour la transposase.

#### **4/ Conclusion :**

L'étude de ces ICE montre que beaucoup de chemin reste à parcourir pour comprendre leur rôle, leur mécanisme et leur évolution. Notre étude a soulevé plus de questions que de réponses qui seront certainement en partie résolues lorsque les séquençages de la souche 5632 de *M.agalactiae* et des souches types de *M.bovis* et *M.agalactiae* seront terminés. Mais, si un transfert entre *M.agalactiae* et *M.bovis* existe et pouvait être démontré expérimentalement, cette découverte laisserait supposer que de tels transferts existent lors de l'infection naturelle ce qui expliquerait la présence de séquences communes à ces deux espèces et les limites et difficultés du diagnostic de laboratoire. Au niveau de la physiopathologie, l'échange de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène entre *M.agalactiae* et *M.bovis*, pourrait être à l'origine d'un élargissement de leur spectre d'hôte. Dans ce cas, *M.bovis* pourrait devenir pathogène pour les ovins-caprins et inversement, *M. agalactiae* pourrait infecter avec succès les bovins,

par exemple par acquisition de protéines nécessaires à l'adhésion ou d'autres facteurs de pathogénicité. Ceci pourrait avoir un impact sur les décisions que le praticien est amené à prendre sur le terrain lorsqu'il est confronté à des problèmes de mycoplasmoses.

De plus, cette étude constitue un premier pas dans la caractérisation d'un ICE chez *M. agalactiae* et *M. bovis* et devra être complétée par une étude structurale complète et fonctionnelle détaillée. La mise en œuvre de telles études, plus hasardeuses, devra reposer sur l'utilisation d'outils de génétique moléculaire encore absents ou en début de développement chez ces deux *Mollicutes*, sur lesquels l'équipe de mycoplasnologie de l'ENVT travaille depuis peu.

Cette étude ouvre donc de nombreuses perspectives aux niveaux génétiques, pathogéniques et de l'évolution des génomes non seulement au sein du genre *Mycoplasma* mais aussi pour tous les autres genres bactériens.

## **5/ Matériels et méthodes :**

### **5.1-Souches utilisées :**

Les souches de *M.agalactiae* et de *M.bovis* utilisées dans cette étude proviennent de la collection maintenue par F. Poumarat de l'AFSSA Lyon (France) et sont présentées dans les tableaux 11, 12 et 13. Le tableau 11 présente 33 souches de *M.agalactiae* de provenances diverses dont la souche type PG2 et le tableau 12 les 46 souches de *M.agalactiae* des Pyrénées atlantiques. Le tableau 13 regroupe les 57 souches de *M.bovis* dont la souche type PG45. L'identification de ces souches a été réalisée par la technique d'immunoempreinte sur membrane de filtration à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques de lapin à l'AFSSA Lyon [47]. Les cultures des souches de mycoplasmes sont réalisées en milieu liquide SP-4 [67] ou en milieu liquide Aluotto [1] à 37°C.

### **5.2-Oligonucléotides utilisés :**

Tous les oligonucléotides utilisés pour les PCR proviennent de GENSET OLIGOS et sont répertoriés dans le tableau 14. Les positions des différentes amorces utilisées sont représentées sur la figure 10.

### **5.3- Les enzymes de restriction utilisées :**

Les enzymes de restriction, leurs sites de coupure et les tampons de réaction utilisés sont répertoriés dans le tableau 15. Les positions des sites de restriction des séquences clonées 703 et 707 sont représentées à la figure 11.

| <b>Souche</b> | <b>Pays</b>   | <b>Source</b> | <b>Hôte</b> | <b>Année</b> |
|---------------|---------------|---------------|-------------|--------------|
| PG2 type      | Espagne       | ND            | caprin      | 1950         |
| 9             | Sardaigne     | lait          | ovin        | ND           |
| 190           | Roumanie      | ND            | ND          | 1951         |
| 209           | France        | lait          | caprin      | 1983         |
| 332           | France        | articulation  | ovin        | 1998         |
| 3990          | France        | ND            | ND          | < 1984       |
| 4021          | France        | lait          | ovin        | 1988         |
| 4025          | France        | lait          | ovin        | 1988         |
| 4054          | France        | lait          | caprin      | 1986         |
| 4055          | France        | lait          | caprin      | 1987         |
| 4210          | France        | lait          | caprin      | 1982         |
| 4212          | France        | lait          | ND          | 1986         |
| 4258          | France        | lait          | caprin      | 1989         |
| 5210          | France        | lait          | ND          | 1988         |
| 5225          | Espagne       | lait          | caprin      | 1991         |
| 5632          | Espagne       | articulation  | caprin      | 1991         |
| 5670          | Espagne       | lait          | ovin        | 1991         |
| 5725          | France        | lait          | ovin        | 1990         |
| 5826          | Espagne       | lait          | ovin        | 1992         |
| 6833          | Italie        | lait          | caprin      | 1993         |
| 6968          | Espagne       | lait          | ovin        | 1993         |
| 7169          | Suisse        | lait          | caprin      | < 1993       |
| 7314          | Grèce         | lait          | ovin        | 1986         |
| 7327          | France        | lait          | caprin      | 1987         |
| 7375          | Suisse        | lait          | caprin      | < 1993       |
| 7784          | France        | lait          | ovin        | 1994         |
| 8062*         | Ethiopie      | poumon        | caprin      | 1987         |
| 8063*         | Turquie       | ND            | ND          | 1988         |
| 8064          | Côte d'Ivoire | poumon        | ovin        | 1989         |
| 8750          | France        | lait          | ovin        | 1995         |
| 9385          | Portugal      | lait          | caprin      | < 1996       |
| 9600          | Portugal      | lait          | caprin      | < 1996       |
| 9875          | Espagne       | lait          | ovin        | < 1996       |

\* Ces deux souches ont été identifiées ultérieurement comme étant *M. bovis* et non *M. agalactiae* (M. Marenda, pers.comm.).

**Tableau 11** : Souches de *M.agalactiae* utilisées.

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

**Tableau 12** : Souches de *M.agalactiae* des Pyrénées Atlantiques utilisées.

L'année d'isolement de ces souches est indiquée. Ces souches ont toutes été isolées à partir d'échantillons de lait de brebis.

| Souche    | Pays      | Source       | Hôte  | Année | Symptômes     |
|-----------|-----------|--------------|-------|-------|---------------|
| PG45 type | USA       | lait         | bovin | 1962  | mammites      |
| 2000      | Tunisie   | poumon       | ND    | 1984  | respiratoires |
| 2038      | France    | articulation | bovin | 1986  | arthrites     |
| 2040      | France    | poumon       | bovin | 1984  | respiratoires |
| 2041      | France    | poumon       | bovin | 1979  | respiratoires |
| 2094      | France    | mucus utérin | bovin | 1985  | métrites      |
| 2209      | France    | poumon       | bovin | 1978  | respiratoires |
| 2260      | France    | poumon       | bovin | 1982  | respiratoires |
| 3724      | France    | poumon       | bovin | 1989  | respiratoires |
| 4235      | Espagne   | lait         | bovin | 1989  | mammites      |
| 4785      | France    | poumon       | ND    | 1990  | respiratoires |
| 5268      | France    | articulation | ND    | 1991  | arthrites     |
| 6655      | Italie    | poumon       | bovin | 1993  | respiratoires |
| 6667      | Italie    | poumon       | bovin | 1993  | respiratoires |
| 6692      | France    | lait         | bovin | 1993  | mammites      |
| 6719      | Italie    | poumon       | bovin | 1993  | respiratoires |
| 6725      | Italie    | poumon       | bovin | 1993  | respiratoires |
| 6733      | Italie    | poumon       | bovin | 1993  | respiratoires |
| 6743      | Suisse    | lait ?       | bovin | 1993  | mammites      |
| 6782      | Allemagne | lait         | bovin | 1993  | mammites      |
| 7224      | Suisse    | poumon       | bovin | 1993  | respiratoires |

|       |           |                  |       |      |                          |
|-------|-----------|------------------|-------|------|--------------------------|
| 7515  | Suisse    | poumon           | bovin | 1993 | respiratoires            |
| 7761  | Espagne   | lait             | bovin | 1994 | Mammites                 |
| 8919  | Suisse    | lait             | bovin | 1995 | mammites                 |
| 9408  | France    | articulation     | bovin | 1996 | Arthrites, respiratoires |
| 9519  | Espagne   | lait             | ND    | 1996 | mammites                 |
| 9555  | France    | articulation     | bovin | 1996 | arthrites                |
| 9583  | Espagne   | lait             | bovin | 1996 | mammites                 |
| 9591  | France    | poumon           | bovin | 1996 | respiratoires            |
| 9760  | Espagne   | lait             | ND    | 1996 | mammites                 |
| 9804  | France    | poumon           | bovin | 1996 | respiratoires            |
| 9903  | Italie    | lait             | bovin | 1996 | mammites                 |
| 9910  | Espagne   | poumon           | ND    | 1996 | respiratoires            |
| 10182 | Belgique  | poumon           | ND    | 1997 | respiratoires            |
| 10202 | Espagne   | poumon           | cerf  | 1997 | ND                       |
| 10205 | Irlande   | ND               | bovin | 1997 | mammites                 |
| 10223 | Irlande   | ND               | bovin | 1997 | mammites                 |
| 10230 | Irlande   | ND               | bovin | 1997 | mammites                 |
| 10237 | Espagne   | lait             | bovin | 1997 | ND                       |
| 10242 | Suisse    | lait             | bovin | 1997 | mammites                 |
| 10256 | France    | articulation     | bovin | 1998 | arthrites                |
| 10280 | Suisse    | poumon           | bovin | 1997 | respiratoires            |
| 10445 | Suisse    | mamelle          | bovin | 1997 | mammites                 |
| 10446 | Irlande   | ND               | bovin | 1998 | ND                       |
| 10516 | Espagne   | lait             | bovin | 1998 | ND                       |
| 10517 | Allemagne | ND               | ND    | 1998 | ND                       |
| 10632 | France    | poumon           | bovin | 1998 | respiratoires            |
| 10807 | France    | ND               | bovin | 1999 | ND                       |
| 10973 | France    | poumon           | bovin | 1999 | lésions de pneumonie     |
| 11362 | France    | poumon           | bovin | 1999 | respiratoires            |
| 11368 | France    | poumon           | bovin | 2000 | ND                       |
| 11436 | Espagne   | ND               | ND    | 2000 | ND                       |
| 11479 | France    | poumon           | bovin | 2000 | ND                       |
| 12111 | Grèce     | ND               | ND    | ND   | 2001                     |
| 12335 | France    | appareil génital | ND    | 2001 | ND                       |
| 12597 | France    | poumon           | bovin | 2001 | respiratoires            |
| 12670 | France    | articulation     | bovin | 2001 | arthrites                |

**Tableau 13** : Souches de *M.bovis* utilisées.

| NOM          | SEQUENCE (5'-3')                   | TAILLE | Tm en °C |
|--------------|------------------------------------|--------|----------|
| A-F-ice      | 5'-GCCAATAGATTTCAAAGTGAACG-3'      | 23     | 53       |
| A-R-ice      | 5'-GCTCTGCCATAGCCATCAAT-3'         | 20     | 60       |
| B-F-ice      | 5'-TTCTGCAACAAATTTGCTTTT-3'        | 22     | 52       |
| B-R-ice      | 5'-TCAATCTCTTTCATCCACAAGG-3'       | 22     | 51       |
| orf7a-F-ice  | 5'-GCCATCTACAGCGATTCTTCTGTC-3'     | 21     | 51       |
| orf7a-R-ice  | 5'-TCAGTTGCTTTTGGGCTTTT-3'         | 20     | 56       |
| orf15-F      | 5'-ATACAGCTGGATTAACAAAACACTACAA-3' | 26     | 51       |
| orf15-R      | 5'-CTAGCTACTCCCGGTGATGG-3'         | 20     | 64       |
| orf16b-F-ice | 5'-CCCAAGCATATTTGCTCACA-3'         | 20     | 58       |
| orf16b-R-ice | 5'-CGCTGCTTCTGGTAATCCAC-3'         | 20     | 62       |
| 703-F-P      | 5'-GCAGGTGCTATTAGCGTGTTT-3'        | 21     | 52       |
| 707-R-E      | 5'-GCAATGCAAAAGGCCTAAAT-3'         | 20     | 56       |
| orf19a-F-ice | 5'-GTGCCAGCATTAGGGAGTTT-3'         | 20     | 60       |
| orf19a-R-ice | 5'-GCCTTCTCTTTCGCAGTTTG-3'         | 20     | 60       |
| Db-F-ice     | 5'-ATGCTTTGCTTGATGATGGT-3'         | 20     | 56       |
| Db-R-ice     | 5'-AGCCCTTCTTGCCTTTTTC-3'          | 20     | 58       |

**Tableau 14** : Oligonucléotides utilisés.

| Nom de l'enzyme            | Site de coupure          | Tampon de réaction  |
|----------------------------|--------------------------|---------------------|
| <i>Bam</i> HI (Boheringer) | G ↓ GATC C<br>C CTAG ↑ G | 10 X E (Promega)    |
| <i>Cla</i> I (Roche)       | AT ↓ CG AT<br>TA GC ↑ TA | 10 X H (Boheringer) |
| <i>Eco</i> RI (Promega)    | G ↓ AATT C<br>C TTAA ↓ G | 10 X H (Boheringer) |
| <i>Eco</i> RV (Promega)    | GAT ↓ ATC<br>CTA ↑ TAG   | 10 X D (Promega)    |
| <i>Hind</i> III (Promega)  | A ↓ AGCT T<br>T TCGA ↑ A | 10 X E (Promega)    |
| <i>Pst</i> I (Promega)     | C TGCA ↓ G<br>G ↑ ACGT C | 10 X H (Boheringer) |
| <i>Xba</i> I (Promega)     | T ↓ CTAG A<br>A GATC ↑ T | 10 X D (Promega)    |

**Tableau 15** : Enzymes de restriction utilisées

#### **5.4- Les séquences d'ADN clonées utilisées :**

Les plasmides PMM703 et PMM707, utilisés comme matrices pour la fabrication de sondes, résultent de l'insertion des deux fragments *EcoRI* homologues à l'ICE de la souche PG18 de *M.fermentans* dans le vecteur plasmidique pBluescript (Stratagene) clonés dans *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  selon les recommandations du fabricant.

#### **5.5- Les préparations d'ADN :**

Les ADN génomiques utilisés dans cette étude sont préparés à partir d'1 ml de culture starter en milieu SP-4 inoculé dans 30 ml du même milieu pour permettre la croissance jusqu'à la phase semi-logarithmique. Les cultures des souches utilisées sont centrifugées à 14 000 g 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 pH 8,0 10mM ; EDTA 10 mM ; NaCl 10 mM) puis incubés 18 heures 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 RNase A DNase free (Boehringer) et incubation pendant 30 min à 37°C, une étape d'extraction est effectuée en ajoutant 500  $\mu$ l de phénol équilibré avec du tampon B (Tris pH 8,0 500 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 12 000 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 0,25 NaOAc (concentration finale), puis sont lavés deux fois dans de l'éthanol à 70 %, séchés et resuspendus dans 400  $\mu$ l d'eau.

#### **5.6- Les PCR réalisées au cours de cette étude:**

Les PCR sont réalisées avec un thermocycler MJResearch PT100, avec de la Taq polymérase recombinante (NewEngland Biolabs). Le tampon de réaction provient aussi de NewEngland Biolabs. Programmes PCR utilisés : 2 min à 94°C, 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à la température d'annealing (Tableau 14).

### **5.6.1- PCR pour mettre en évidence la colinéarité au génome des séquences 703 et 707 :**

Pour réaliser cette PCR, le couple d'amorces 703-F-P et 707-R-E dont la position est représentée à la figure 10 et 50 ng d'ADN de la souche 5632 de *M.agalactiae* ont été utilisés. Les produits obtenus par PCR ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *PstI*.

### **5.6.2- PCR pour l'obtention de sondes :**

Les sondes sont obtenues avec 10 ng d'ADN et de la Digoxigenine-11-dUTP (Roche) utilisée avec un rapport dig-dUTP/dTTP de 1/20. Les amorces et l'ADN nécessaires à l'obtention des sondes sont donnés dans le tableau 16. L'efficacité de la PCR est contrôlée sur gel d'agarose à 1 %.

8 sondes ont été synthétisées et 3 sondes : la sonde E73 spécifique de la souche type PG45 de *M.bovis*, C38 et C48 spécifiques de la souche 5632 de *M.agalactiae* avaient déjà été produites avec les amorces J24 et N24 [43]. Ces 3 sondes ont été réutilisées pour cette étude. Les positions des différents couples d'amorces et des trois sondes déjà synthétisées sont représentées à la figure 10.

| Noms des sondes | Amorces                   | Matrice  |
|-----------------|---------------------------|--|
| A               | A-F-ice/A-R-ice           | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 703 (PMM703) |
| B               | B-F-ice/B-R-ice           | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 703 (PMM703) |
| ORF7            | orf7a-F-ice/orf7a-R-ice   | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 703 (PMM703) |
| ORF15           | orf15-F-ice/orf15-R-ice   | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 703 (PMM703) |
| ORF16           | orf16b-F-ice/orf16b-R-ice | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 703 (PMM703) |
| C               | 703-F-P/707-R-E           | ADN génomique de la souche 5632 de <i>M.agalactiae</i>           |
| ORF19           | orf19a-F-ice/orf19a-R-ice | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 707 (PMM707) |
| D               | Db-F-ice/Db-R-ice         | vecteur plasmidique pBluescript portant la séquence 707(PMM707)  |

**Tableau 16 :** Amorces et matrices utilisées pour l'obtention des différentes sondes

### 5.7- Digestions des ADN :

1,5 µg des ADN génomiques des souches 3990, 5632, 8064 et PG2 de *M.agalactiae* ont été digérés par les enzymes de restriction *XbaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *HindIII*, *ClaI* et *BamHI* à 37°C pendant 18 heures. Des digestions de 1,5 µg d'ADN génomique de la souche 5632 de *M.agalactiae* sont réalisées avec deux enzymes de restriction : *XbaI/PstI*, *XbaI/ClaI*, *PstI/ClaI*, *BamHI/ClaI*, *BamHI/XbaI* et *BamHI/PstI* à 37°C pendant 18 heures.

## **5.8- Southern blot réalisés au cours de cette étude :**

### **5.8.1- Southern blot pour la caractérisation des souches possédant l'ICE :**

Pour la caractérisation des souches comportant l'ICE, 1 µg d'ADN génomique des souches présentées dans les tableaux 11, 12 et 13 est digéré par *EcoRI* et après électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 % ces ADN sont transférés sur une membrane de nylon (Roche) selon les recommandations du fabricant.

### **5.8.2-Southern blot pour l'étude en dehors des bornes des séquences clonées :**

Ces southern blot résultent de la migration des produits de digestion de l'ADN génomique des souches 5632, 3990 et 8064 de *M.agalactiae* dans un gel d'agarose à 0,8 % transférés sur une membrane de nylon (Roche) selon les recommandations du fabricant.

Pour l'ensemble de ces southern blot, les sondes sont incubées 18 heures à 60°C avec les membranes dans du tampon de Church (SDS 7 % ; BSA 1 % ; Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2 0,25 M). Puis les membranes sont rincées dans du tampon 0,2 X SSC et 0,1 % SDS et lavées dans cette solution pendant 1 heure 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).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1-ALUOTTO BB, WITTLER RG, WILLIAMS CO and FABER JE.  
Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasmas species.  
*Int. System. Bacteriol.*, 1970, **20**: 35-58.
- 2-BARRE A, DE DARUVAR A and BLANCHARD A. (Page consultée le 8 août 2004)  
Molligen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes.  
Adresse URL: <http://www.cbi.labi.fr/outils/molligen>
- 3-BASHIRUDDIN JB, FREY J, KONIGSSON MH, JOHANSSON KE, HOTZEL H, DILLER R, SANTIS P, BOTELHO A, AYLING RD, NICHOLAS RAJ, THIAUCOURT F and SACHSE K. (Page consultée le 3 novembre 2004).  
Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* : a collaborative trial.  
Article sous presse consultable à l'adresse URL: <http://www.elsevier.com/locate/vjl>
- 4-BERGONIER D, VAN DE WIELE A, MARENDA M et BERTHELOT X.  
L'agalactie contagieuse chez les ovins.  
*Le point vétérinaire*, 2002, **33**, numéro spécial pathologie ovine et caprine : 52-57.
- 5-BERGONIER D, DE SIMONE F, RUSSO P, SOLSANA M, LAMBERT M et POUMARAT F.  
Variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies.  
*Fems microbiology letters*, 1996, **143** : 159-165.
- 6-BLOOD DC, RADOSTITS OM and GAY CC.  
Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.  
8th edition. Baillière Tindall, 1994: 1763 pages.
- 7-BLUM G, OTT M, LISCHEWSKI A, RITTER A, IMRICH H, TSHAPE H and HACKER J.  
Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tARN-specific loci in the chromosome of an Escherichia coli wild type pathogen.  
*Infection and immunity*, 1994, **62**, **2** : 606-614.
- 8-BOLTNER D, MACMAHON C, PEMBROKE JT, STRIKE P and OSBORN AM.  
R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid and transposons elements.  
*J. bacteriol.*, Sept 2002, **184**, **18**: 5158-5169.
- 9-BOLTNER D and OSBORN AA.  
Structural comparison of the integrative and conjugative elements R391, PMERPH, R997 and SXT.  
*Plasmid*, 2004, **51**: 12-23.
- 10-BONNEFIN N.  
Comparaison de la souche 7784 hypovirulente de *Mycoplasma agalactiae* à la souche type virulente PG2 par la technique d'hybridation soustractive suppressive.  
Th D : pathologie de la reproduction, Toulouse, 2003-TOU 3-4154 :92 pages.

- 11-BURRUS V, PAVLOVIC G, DECARIS B and GUEDON G.  
The ICES<sub>t1</sub> element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration.  
*Plasmid*, May 2002, 48: 77-97.
- 12-BURRUS V, PAVLOVIC G, DECARIS B and GUEDON G.  
Conjugative transposons: the tip of the iceberg.  
*Mol. biol.*, July 2002, 46, 3: 601-610.
- 13-BURRUS V, ROUSSEL Y, DECARIS B and GUEDON G.  
Characterisation of a novel integrative element ICES<sub>t1</sub>, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*.  
*Applied and environmental microbiology*, Apr 2000, 66, 4: 1749-1753.
- 14-BURRUS V and WALDOR MK.  
Control of SXT integration and excision.  
*J.bacteriol.* Sept 2003, 185, 17: 5045-5054.
- 15-BURRUS V and WALDOR MK.  
Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements.  
*Research in microbiology*, 2004, 155: 376-386.
- 16-CALCUTT MJ, LAVRRAR JL and WISE KS.  
IS1630 of *Mycoplasma fermentans* a novel IS30-type insertion element that targets and duplicates inverted repeats of variable length and sequence during insertion.  
*J. bacteriol.*, Dec 1990, 181, 24: 7597-7607.
- 17-CALCUTT MJ, LEWIS MS and WISE KS.  
Molecular genetic analysis of ICEF, an integrative conjugal element that is present as a repetitive sequence in the chromosome of *Mycoplasma fermentans* PG18.  
*J. bacteriol.*, Dec 2002, 184, 24: 6929-6941.
- 18-CAPARON MG and SCOTT JR.  
Excision and insertion of the conjugative transposon Tn916 involves a novel recombination mechanism.  
*Cell*, 1989, 59 : 1027-1034
- 19-CELLI J, POYART C and TRIEU-CUOT P.  
Use of an excision reporter plasmid to study the intracellular mobility of the conjugative transposon Tn916 in gram positive bacteria.  
*Microbiol.*, 1997, 143: 1253-1261.
- 20-CHENG Q, SUTANTO Y, SHOEMAKER JF, GARDNER F and SALYERS AA.  
Identification of genes required for excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposons.  
*Mol. Microbiol.*, 2001, 41, 3 : 625-632.
- 21-CLEWELL DB, FLANNAGAN SE, JAWORSKI DD.  
Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons.  
*Microbiology*, 1995, 3, 6: 229-236.

22-COURVALIN P.

Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria.  
*Agents chemother*, 1994, 38: 1447-1451.

23-DUQUESNOY F.

Modification de la production laitière par inoculation intramammaire chez la brebis d'un surnageant de culture de *Mycoplasma agalactiae*.

Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 2000-TOU 3-4079 : 105 pages.

24-DYBVIG K, FRENCH CT and LEROY LL.

Construction and use of derivatives of transposon Tn4001 that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritis*.

*J.Bacteriol.*, Aug 2000, 182, 15: 4343-4347.

25-DYBVIG K, SITARAMAN R and FRENCH CT.

A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements.

*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95: 13923-13928.

26-FLEURY B, BERGONIER D, BERTHELOT X, PETERHANS E, FREY J and VILEI EM.

Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*.

*Infection and immunity*, Oct 2002, 70, 10: 5612-5621.

27-GROHMANN E, MUTH G and ESPINOSA M.

Conjugative plasmid transfer in gram positive bacteria.

*Microbiology and molecular biology reviews*, June 2003, 67, 2: 277-301.

28-HALE HH, HELMBOLDT CF, PLASTRIDGE WN and STULA EF.

Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species.

*Cornell Vet.*, 1955, 52 : 582-591.

29-HENTSCHEL U and HACKER J.

Pathogenicity islands : the tip of the iceberg.

*Microbes and infection*, 2001, 3: 545-548.

30-HOCHHUT B, BEABER JW, WOODGATE R and WALDOR MK.

Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site.

*J.bacteriol.*, Feb 2001, 183, 4: 112461132.

31-HOCHHUT B, LOFTI Y, MAZEL D, FARUQUE S, WOODGATE R and WALDOR MK.

Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constains.

*Antimicrobial agents and chemotherapy*, Nov 2001, 45, 11: 2991-3000.

32-HOCHHUT B and WALDOR M.

Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*.

*Mol. biol.*, 1999, 32, 1: 99-110.

- 33-KING KW and DYBVIG K.  
Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMK1.  
*Plasmid*, 1994, 31: 49-59.
- 34-KONIGSSON M, BOLSKE G and JOHANSSON.  
Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains.  
*Veterinary microbiology*, 2002, 85: 209-220.
- 35-KRAUSE DC.  
*Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle.  
*Trends Microbiol.*, 1988, 6:15-18.
- 36-KRAUSE DC, LEITH DK, WILSON RM and BASEMAN JB.  
Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence.  
*Infection and immunity*, 1982, 35: 809-817.
- 37-LEGRAND D, ARCANGIOLI MA, GIRAUD N, POUMARAT F, BEZILLE P et BERGONIER D.  
Conduite à tenir face à des mammites à mycoplasmes.  
*Le point vétérinaire*, mai 2004, 245 : 34-37.
- 38-LEWIN B.  
Genes VI  
Oxford, Oxford university press, 1997, 1267 pages.
- 39-LLOSA M, GOMIS-RUTH FX, COLL M and DE LA CRUZ F.  
Bacterial conjugation : a two-step mechanism for DNA transport.  
*Mol. microbiol.*, 2002, 45, 1: 1-8.
- 40-MAEDA T et al.  
*Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumoniae in bull calves.  
*J.comp.path*, 2003, 129: 100-110.
- 41-MAHILLON J and CHANDLER M.  
Insertion sequences.  
*Microbiol. and mol. Biol. reviews*, Sept 1998, 62, 3: 725-774.
- 42-MANHILOFF J, McELAHNEY RN, FINCH LR and BASEMAN JB.  
*Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*.  
Washington, American society for microbiology, 1992: 355-361.
- 43-MARENDA M, VILEI E, POUMARAT F, FREY J and 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.  
*Vet. Res.*, 2004, 35: 199-212.
- 44-NICHOLAS RAJ and AYLING RD.  
*Mycoplasma bovis: disease, diagnosis and control*.  
*Research in veterinary science*, 2003, 74: 105-112.

45-NURIT M.

Reproduction expérimentale des mammites à *Mycoplasma agalctiae* chez la brebis : activité biologique des surnageants de culture.

Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 2001-TOU 3- 4127 : 46 pages.

46-PILO P, FLEURY B, MARENDI M, FREY J and VILEI EM .

Prevalence and distribution of the insertion element ISmag1 in *Mycoplasma agalactiae*.

*Veterinary microbiology*, 2003, 92: 37-48.

47-POUMARAT F, PERRIN B, LONGCHAMBON D.

Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration.

*Vet. Microbiol.*, 1991, 29: 329-338.

48-RAZIN S and FREUNDT EA.

The mycoplasmas in Bergey's manual of systematic bacteriology.

Baltimore: Wiliam and Wilkins, edited by JG Holt, 1984 : 749.

49-RAZIN S and HERMANN R.

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.

New York, Kluwer academic/ Plenum publishers New York 2002, 572 pages.

50-RAZIN S, YOGEV D and NAOT Y.

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.

*Microbiol. and mol. biol reviews*, Dec 1998, 62, 4: 1094-1156.

51-RENAUDIN J.

Extrachromosomal elements and gene transfer.

In : RAZIN S and HERMANN R.

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.

New York, Kluwer academic/ Plenum publishers New York, 2002, 347-364.

52-RENAUDIN J and BOVE JM.

SpV1 and SpV4 spiroplasma viruses with circular, single stranded DNA genomes, and their contribution to the molecular biology of spiroplasmas.

*Adv. Virus Res.*, 1994, 44: 429-463.

53-ROBERTS AP, JOHANESEN PA, LYRAS D, MULLANY and ROOD JL.

Comparison of Tn5397 from *Enterococcus faecalis* and the CW459tet(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules.

*Microbiol.*, 2001, 147: 1243-1251.

54-ROBERTS MC and KENNY GE.

Conjugal transfer of transposon Tn916 from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*.

*J. bacteriol.*, Aug 1987, 169, 8: 3836-3839.

55-ROSKE K, CALCUTT MJ and WISE KS.

The *Mycoplasma fermentans* prophage MFV1 : genome organization mobility and variable expression of an encoded surface protein.

*Mol.microbiol.*, 2004, 52, 6: 1703-1720.

- 56-RUDY C, TAYLOR LK, HINERFELD D, SCOTT JR and CHURCHWARD G;  
Excision of a conjugative transposon in vitro by the Int and Xis proteins of Tn916.  
*Nucleic acid research*, 1997, 27, 20: 4061-4066.
- 57-SACHSE K, HELBIG JH, LYSNYANSKY C, GRAJETZKI C, MULLER W, JACOBS D  
and YOGEV D.  
Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of  
*Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins.  
*Infection and immunity*, 2000, 68, 2: 680-687.
- 58-SALYERS AA, SHOEMAKER NB, STEVENS AM and LI LY.  
Conjugative transposons : an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements.  
*Microbiological reviews*. Dec 1995, 59, 4: 579-590.
- 59-SMEETS LC and KUSTERS JG.  
Natural transformation in *Helicobacter pylori* : DNA transport in an unexpected way.  
*Microbiology*, April 2002, 10, 4: 159-161.
- 60-SUBRAMANIAM S, BERGONIER D, POUMARAT F, CAPAUL S, SCHALTTER Y  
NICOLET J and FREY J.  
Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC*  
genes by PCR.  
*Molecular and cellular probes*, 1998, 12: 161-169.
- 61-SWARTLEY JS, MCALLISTER CF, HAJJEH RA, HEINRICH DW and STEPHENS  
DF.  
Deletions of Tn916-like transposons are implicated in tetM-mediated resistance in pathogenic  
*Neisseria*.  
*Mol. Microbiol*, 1993, 10 : 299-310.
- 62-TEACHMAN AM, FRENCH CT, YU H, SIMMONS WL and DYBVIK K.  
Gene transfer in *Mycoplasma pulmonis*.  
*J. bacteriol.*, Feb 2002, 184, 4: 947-951.
- 63-THOMAS A, DIZIER I, LINDEN A, MAINIL J, FREY J and VILEI EM.  
Conservation of the *uvrC* gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR  
diagnosis.  
*The veterinary journal*, 2003, 168/ 100-102.
- 64-TOLA S, INDI G, ROCCHIGIANI AM, MANUNTA D, ANGIAI PP, ROCCA S,  
COCCO M and LEORIG.  
Comparison of restriction pattern polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma*  
*bovis* by pulsed field electrophoresis.  
*J. Vet. Med. Biol.*, 1999, 46: 199-206.
- 65-TOUSSAINT A and MERLIN C.  
Mobile elements as combination of functional modules.  
*Plasmid*, 2002, 42: 26-35.
- 66-TU AH, VOELKER LL, SHEN X and DYBVIK K.  
Complete nucleotide sequence of the *Mycoplasma virus P1* genome.  
*Plasmid*, 2000, 45: 122-126.

67-TULLY JG.

Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes.  
Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: Molecular characterization edited  
by Razin and Tully, Academic press, San Diego, 1995: 33-39.

68-VOELKER LL and DYBVIG K.

Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis* : transformation, conjugal transfer of Tn916, and  
evidence for a restriction system recognizing AGCT.  
*J.Bacteriol.*, 1996, 178: 6078-6081.

69-VOELKER LL and DYBVIG K.

Characterization of the lysogenic bacteriophage MAV1 from *Mycoplasma arthritidis*.  
*J. bacteriol.*, Nov 1998, 180, 22: 5928-5931.

70-VOELKER LL and DYBVIG K.

Sequence analysis of the *Mycoplasma arthritidis* bacteriophage MAV1 genome identifies the  
putative virulence factor.  
*Gene*, 1999, 233: 101-107.

71-WASHBURN LR, MILLER EJ, MUKHERJEE S and DANNENBRING D.

*Mycoplasma arthritidis* bacteriophage MAV1 prophage integration, deletions and strain-related  
polymorphisms.  
*Plasmid*, 2004, 52: 31-47.

72-WATERS VL.

Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance.  
*Frontiers in bioscience* 4, May 1999: 416-439.

73-WEISBURG WG, ROSE DL, PETZEL JP, OYAIZU H, YANG D, MANDELCO L,  
SECHREST J, LAWRENCE TG, VAN ETTEN J, MANILOFF J and WOESE CR.

A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification.  
*J. bacteriol.*, Dec 1989, 171, 12: 6455-6467.