

## ARTICLES ORIGINAUX

# Recherches immunologiques sur la péripneumonie

## V. Relations antigéniques entre *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, *Mycoplasma mycoides* var. *capri* et d'autres microorganismes du genre *Mycoplasma* (Souches génitales bovines et humaines \*)

par J.M. VILLEMOT et A. PROVOST

La conduite de la prophylaxie de la péripneumonie contagieuse des bovidés est basée, dans des pays tels que la Nigeria, le Soudan et la République Centrafricaine, sur la réaction d'agglutination rapide sur lame. Quoique celle-ci ait fait ses preuves en brousse pour le diagnostic de la péripneumonie dans une collectivité bovine, de fausses réactions positives peuvent se manifester lors de diagnostics pratiqués sur quelques bêtes seulement. Jusqu'ici étaient connus les résultats faussement négatifs que l'on rencontrait sur des animaux en période d'incubation, sur des animaux en très mauvais état général, ou sur des animaux à la phase agonique, lorsque le torrent circulatoire se trouve envahi par les antigènes péripneumoniques. La conférence organisée par la C.C.T.A. à Kaduna (Nigeria) en décembre 1958, réunissant les vétérinaires intéressés par une collaboration interterritoriale dans le domaine de la lutte sur le terrain contre la peste bovine et la péripneumonie en Afrique dans les régions du Niger et du Tchad, permit à différents orateurs de confronter leur expérience à ce sujet. Tous reconnurent que le test d'agglutination rapide sur lame demeurait le seul instrument pratique de dépistage que possède le vétérinaire en brousse, lorsqu'il s'agit d'un cheptel infecté.

Lindley (1), en Nigeria, met en garde les vétérinaires qui seraient tentés d'utiliser le diagnostic d'agglutination sur lame dans les cas individuels et signale les erreurs par défaut que nous avons évoquées plus haut.

Les recherches immunologiques que nous avons entreprises dès le début 1957 avaient pour but de mieux connaître la structure antigénique de *Mycoplasma mycoides*, d'étudier les relations antigéniques de ce germe avec d'autres microorganismes, et par là même d'expliquer les fausses réactions positives lors du test d'agglutination sur lame. Provost (2) étudie les relations sérologiques existant entre le virus vaccinal et *Mycoplasma mycoides*; Provost, Villemot, Queval et Valenza (3) passent en revue les relations antigéniques qu'ils ont mis en évidence entre *Mycoplasma mycoides*, d'autres *Mycoplasma* et certaines bactéries.

### HISTORIQUE

Peu de recherches ont été faites jusqu'ici sur les relations antigéniques croisées entre les différents organismes du genre *Mycoplasma*. Les observations sont souvent fragmentaires, dispersées dans la littérature et peu d'auteurs se sont efforcés jusqu'à présent de faire une synthèse de nos connaissances sur ce point. Il est à remarquer, par ailleurs, que la systématique de ce groupe microbien est basée sur des caractères culturels et ne fait pas appel à une classification sérologique, ce qui est la preuve patente de la pauvreté de nos lumières sur ce chapitre.

Edward (4) fait observer que les germes qu'il propose de désigner comme « *Asterococcus*

(\*) Reçu pour publication : octobre 1959.

*mycoides* var. *bovis* » et « *Asterococcus mycoides* var. *capri* » ont des propriétés culturales semblables et que l'épreuve de la fixation du complément conduit à penser que ces deux organismes présentent des antigènes communs. Selon lui, le germe de la pleuropneumonie caprine serait le germe bovin qui se serait adapté à la chèvre.

Dujardin-Beaumetz, dès 1906 (5) avait tenté d'infecter expérimentalement des chèvres et des moutons avec une culture de l'agent de la péripneumonie bovine en bouillon Martin, additionné de sérum de mouton. L'inoculation de 50 à 100 ml d'une telle culture provoquait chez ces animaux une réaction thermique et une réaction locale analogue à la réaction willemsienne, avec cette différence qu'il n'y avait pas de période d'incubation pour l'apparition de ce phénomène, ni chez le mouton, ni chez la chèvre.

Klieneberger-Nobel (6,7) avait constaté, dans ses études sérologiques, que *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* et *Mycoplasma mycoides* var. *capri* possédaient au moins un antigène commun. Dans la monographie de Longley (8) sur la pleuropneumonie contagieuse caprine, il faut relever le tableau de la page 20 qui donne le résultat des agglutinations croisées, entre l'agent de cette maladie et le microorganisme de la péripneumonie des bovidés, faites à l'Institut Lister par Klieneberger-Nobel. Cette étude met en évidence une communauté antigénique entre les deux germes : un sérum antipéripneumonique préparé sur lapin agglutine au 1/640<sup>e</sup> la souche homologe de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, et au 1/10<sup>e</sup> une souche de pleuropneumonie caprine. Le sérum anti-pleuropneumonie de la chèvre agglutine *Mycoplasma mycoides* var. *capri* au 1/160<sup>e</sup>, et donne une réaction douteuse au 1/10<sup>e</sup> avec *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*. Provost et Villemot (9) confirment ces résultats en utilisant des sérums d'un bovin atteint de péripneumonie, de bovins « tout venant », d'une vache infectée expérimentalement avec une souche locale de *Mycoplasma laidlawi*, et d'un âne hypérimmunisé avec la souche « Vom » de *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. Les titres agglutinants croisés ainsi obtenus sont bien plus élevés, puisque le sérum d'un bovin péripneumonique agglutine l'antigène T<sub>3</sub> (*Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*) à la dilu-

tion limite de 1/2560, et l'antigène Vom au 1/40<sup>e</sup>.

Une pathologie variée due à des P.P.L.O. a été décrite chez le mouton et la chèvre par différents auteurs. Cordy, Adler et Yamamoto, en 1955 (10), signalent en Californie une épidémie très meurtrière dans un troupeau de chèvres laitières, se manifestant par une septicémie et des arthrites. L'organisme causal est un germe du genre *Mycoplasma*, différent des agents de l'agalaxie contagieuse et de la pleuropneumonie caprine. Le sérum des malades agglutine jusqu'au 1/640<sup>e</sup> un antigène préparé à partir de la souche homologue, alors qu'un sérum anti-agalaxie n'agglutine pas cet antigène, et qu'un sérum anti-pleuropneumonie caprine donne une agglutination au 1/10<sup>e</sup> seulement.

Longley (8) signale que Klieneberger-Nobel n'a obtenu aucune agglutination de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* et var. *capri* avec un sérum contre l'agalaxie contagieuse des chèvres. Edward (4) sépare également du point de vue sérologique les germes de l'agalaxie contagieuse et de la pleuropneumonie des chèvres.

En Australie, Laws (11), étudiant un germe du groupe des P.P.L.O. causant une péritonite chez la chèvre, transmissible expérimentalement au mouton, trouve par la réaction de fixation du complément des relations antigéniques croisées entre ce nouvel organisme pathogène et *Mycoplasma mycoides*. Il semble donc qu'il existe certaines corrélations dans la structure antigénique des germes de la péripneumonie, de la pleuropneumonie de la chèvre, et des microorganismes pathogènes pour la chèvre décrits par Cordy et coll. en Californie et par Laws en Australie.

Des germes du groupe des P.P.L.O. pathogènes pour le mouton ont été décrits au Canada par Greig (12), en Turquie par Durusan et Doguer (13), en Californie par Boidin, Cordy et Adler (14), en Angola par Heikkila (15) ; cette liste est loin d'être limitative et ne veut donner qu'une idée de la dispersion géographique de ces infections. Ces *Mycoplasma* occasionnent chez le mouton une pleuropneumonie. Aucune étude sérologique ne permet malheureusement de situer ces organismes par rapport aux autres *Mycoplasma*. Une observation mentionnée dans

le rapport de Heikkila est cependant fort intéressante : un bœuf inoculé avec la souche isolée de la pleuropneumonie ovine de l'Angola, en vue de la préparation d'un antisérum, a montré une véritable réaction willemsienne, quelques gouttes de la culture virulente ayant pénétré dans le tissu conjonctif péri-jugulaire. L'œdème qui s'ensuivit fut observé le jour même de l'inoculation. Cet animal mourut le 12<sup>e</sup> jour qui suivit la réaction et « les lésions rencontrées sur le cadavre autopsié du bœuf étaient parfaitement analogues à celles que l'on constate dans une réaction de Willems extrêmement grave, après infection sous-cutanée d'un bovin par une souche virulente de *Borrelomycetes bovis* ».

L'inoculation expérimentale au mouton conduit à une réaction locale se traduisant par de l'œdème du tissu conjonctif sous-cutané.

La question des communautés antigéniques entre l'agent de la péripneumonie bovine et les *Mycoplasma* d'origine génitale est plus discutée. Edward (16) étudie les relations sérologiques existant entre des P.P.L.O. isolés du tractus génital bovin (*Mycoplasma laidlawi* ou souche S, et *Mycoplasma bovigenitalium* ou souche P) et *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*. Le germe de la péripneumonie bovine n'est agglutiné par un antisérum S qu'au titre de 1/8. Les souches P et les souches S étudiées par Edward ne montrent aucune réaction d'agglutination ni de fixation du complément croisées.

Les recherches sérologiques sur les P.P.L.O. d'origine humaine, encore que fragmentaires, ont reçu un début de réalisation. C'est ainsi que Nicol et Edward (17) avaient classé leurs souches de *Mycoplasma hominis* en 4 types, et une souche H. 106 ne s'intégrant dans aucune classification ; ces types étaient différents à la fois par leurs caractères cultureux, leur pouvoir pathogène pour la souris et leur constitution antigénique.

Freundt (18) classe 207 souches de P.P.L.O. humains isolés des voies génito-urinaires et de la bouche en 3 groupes I, II et III qui se distinguent par leur morphologie, leur caractère fermentaire sur les sucres et leur pouvoir hémolytique. Huijsmans-Evers et Ruys (19) ne trouvent aucune réaction sérologique croisée par la réaction de fixation du complément entre les P.P.L.O. génitaux d'origine humaine (*Mycoplasma homi-*

*nis fermentans*), *Mycoplasma hominis salivarius* et *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*. Par contre Kingsbury (20) utilisait la réaction de fixation du complément dans le diagnostic des urétrites amicrobiennes de l'homme avec un antigène préparée à partir d'une souche de péripneumonie bovine. Freundt (18) note avec étonnement une agglutination croisée de 2 souches du groupe III avec *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*. De plus l'adsorption croisée des antisérums avec la souche homologue et hétérologue est totale. Et l'auteur d'ajouter « The occurrence in human beings of two strains presenting very close similarities to the bovine pleuropneumonia organism is rather astonishing » (\*).

En ce qui concerne les nombreux P.P.L.O. isolés sur les autres diverses espèces animales, aucun effort n'a été fait jusqu'ici pour tenter une classification sérologique englobant les autres germes du genre *Mycoplasma*.

Seuls, Adler et Yamamoto (32) ont jeté les bases d'une classification sérologique des P.P.L.O. de la maladie respiratoire chronique des volailles, mais n'y ont pas intégré des *Mycoplasmataceae* des autres espèces animales.

Nous traiterons ici de l'étude des caractères sérologiques de différentes souches de *Mycoplasma*, que nous avons isolées au Tchad (21, 22) et nous proposerons, dans une publication ultérieure, la base d'une classification sérologique des P.P.L.O., comprenant tous les micro-organismes du genre *Mycoplasma*.

## MATERIEL ET METHODES

### 1<sup>o</sup> Souches de *Mycoplasma*.

Il nous paraît nécessaire que, dans les études portant sur les caractères antigéniques des P.P.L.O., les souches utilisées soient encore « sauvages ». Un isolement récent est en effet une garantie que les motifs antigéniques n'ont pu encore subir les modifications qu'entraîne le mode de vie *in vitro*. C'est pour cette raison que nous avons jugé indispensable d'indiquer pour chaque souche le nombre de repiquages sur bouillon que nous avons effectués.

(\*) On ne peut qu'être étonné de l'existence chez l'homme de deux souches présentant de telles similitudes avec l'organisme de la péripneumonie.

### 1° *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*.

Souche Maroua (M) à son 4<sup>e</sup> passage sur bouillon-sérum, pathogène ;

Souche Trec 12 (T) à son 2<sup>e</sup> passage sur bouillon-sérum, moins pathogène que la souche Maroua ;

Souche T<sub>3</sub> de Piercy et Knight (24) à son 39<sup>e</sup> passage sur œuf, suivi de 8 passages en bouillon-sérum, souche vaccinale au Tchad.

### 2° *Mycoplasma mycoides* var. *capri*.

Souche Farcha (F) à son 9<sup>e</sup> passage sur bouillon-sérum, hautement pathogène ;

Souche Vom (V) à son 80<sup>e</sup> passage sur bouillon-sérum, pratiquement avirulente.

### 3° *Mycoplasma laidlawi* (souches « S » de Edward).

— Les souches utilisées ont été isolées au Tchad en deux provinces différentes.

Nous avons décrit ailleurs (21) leurs caractères cultureux et biochimiques. Ce sont les souches III, V, XI, XII, 12 et 35 respectivement à leur 27, 27, 19, 25, 25 et 23<sup>e</sup> passage.

— Souche « L » qui nous a été fort aimablement envoyée par le Docteur D.G. ff. Edward.

### 4° *Mycoplasma bovigenitalium* (souches « P » de Edward).

Nous avons retenu les souches 76 et 106 à leur 17<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> passage en bouillon-sérum. Ces souches ont été également isolées sur vaches zébu-arabe, au Tchad ; leur étude a été faite avec celle des souches S que nous avons décrites (21).

### 5° *Mycoplasma hominis*.

— Souche « N » à son 20<sup>e</sup> passage sur bouillon-sérum. Cette souche a été isolée des selles d'un enfant de 18 mois ayant une entérite avec diarrhée persistante.

— Souche « NIC » à son 14<sup>e</sup> passage sur bouillon-sérum. L'isolement en culture pure de cette souche fut fait à partir de l'urine d'une femme souffrant d'une cystite subaiguë. L'étude détaillée de ces deux souches a été publiée ailleurs (22).

### 2° Préparation des antigènes.

Les antigènes ont été préparés selon les techniques habituelles de ce laboratoire (23). Un examen rigoureux au microscope à contraste de phase nous a permis d'éliminer tous les ballons contenant des souillures. Les cultures ont été centrifugées à l'ultracentrifugeuse Sharples à la vitesse de 40.000 t/m. Les antigènes destinés à l'immunisation des animaux producteurs de sérum et aux agglutinations lentes en tube ont été remis en suspension dans du sérum physiologique stérile de manière à atteindre 2 fois l'opacité du tube n° 10 de l'échelle de Brown, et ajustés à pH 6,8. Les suspensions antigéniques servant aux agglutinations en tube ont été additionnées de merthiolate. Le milieu de remise en suspension utilisé pour l'antigène servant aux agglutinations sur lame est celui dont nous nous servons habituellement (23).

Il est à signaler une modification de la technique primitivement exposée, qui consiste à ne plus faire bouillir la suspension antigénique ; elle a pour but de ne pas détruire les antigènes de surface des corps microbiens, antigènes qui, dans notre conception actuelle de la structure antigénique des P.P.L.O., sont plus spécialement les agglutinogènes intervenant dans la réaction rapide sur lame.

### 3° Antisérums.

Tous nos antisérums ont été préparés sur des ânes, après s'être assuré de l'absence d'agglutinines naturelles dans le sérum de ces animaux.

Le processus d'immunisation comprenait quatre inoculations de 10 ml par voie intraveineuse d'une suspension antigénique étalonée à 2 fois le tube n° 10 de l'échelle de Brown, à sept jours d'intervalle. Des tests d'agglutination sur lame ont été régulièrement pratiqués afin de suivre la montée des agglutinines. Une semaine après la dernière inoculation, une quantité importante de sang a été prélevée de manière à satisfaire aux besoins de l'expérimentation. Certaines souches ont provoqué des chocs du genre anaphylactique lors des inoculations qui ont suivi la première. C'est ainsi qu'il nous fut impossible d'obtenir par ce procédé d'immunisation un sérum anti-V, les 3 ânes que nous avons tenté d'immuniser ayant tous trois fait un choc mortel à la 2<sup>e</sup> inoculation.

## TECHNIQUES

### 1° Réactions d'agglutination.

a) Agglutination rapide sur lame. Cette technique a été décrite ailleurs en détail (23).

b) Agglutination lente en tube. Pour des raisons que nous avons exposées ailleurs (9) nous avons abandonné la méthode préconisée par Manjrekar (25). La suspension antigénique a été standardisée à 2 fois l'opacité du tube n° 10 de l'échelle de Brown, ainsi qu'il a été dit plus haut. Les antisérums furent dilués de 1/10 à 1/2560 par dilutions croissantes de raison 2 et disposés en tubes de Kahn, chacun contenant le mélange de 0,4 ml de chacun des antisérums non dilués ou de leurs dilutions et de 0,4 ml des différents antigènes. Les lectures eurent lieu après une incubation de 24 heures au bain-marie à 37°C. Des témoins sérum d'âne normal non dilué et dilué au 1/10<sup>e</sup>, et un témoin sérum physiologique, ont accompagné toutes les réactions.

### 2° Réaction de précipitation en milieu gélifié.

Nous avons suivi la technique de Oudin, reprise par Ouchterlony et modifiée par Mansi (26), technique que nous avons utilisée et décrite pour le virus rabique (27). Les normes les meilleures, déterminées après divers essais, sont les suivantes : diamètre des cupules et distance des cupules au réservoir central de 7 mm. Le milieu utilisé est celui qui a été décrit par Mansi. Cette technique a permis à White (28) la mise en évidence d'une réaction de précipitation avec un système *Mycoplasma mycoides*-sérum antipéripleurique préparé sur lapin.

### 3° Inhibition de la croissance par les antisérums.

a) Etude du pouvoir bactéricide *in vitro* du sang d'ânes immunisés.

Nous avons suivi la technique de Priestley (29) que nous avons modifiée dans certains détails. Des prélèvements stériles de sang ont été faits sur les ânes immunisés avec les souches XI, XII, 12 et 35. A partir de chaque prélèvement, des volumes de 1 ml sont répartis dans 18 tubes de Kahn stériles et bouchés. Deux gouttes d'une culture de 48 heures des 18 différentes souches de P.P.L.O. dont nous disposons ont servi à ensemercer les tubes de Kahn de manière à réa-

liser un mélange : sang anti-XI + antigène III, sang anti-XI + antigène V, ... sang anti-XII + antigène III..., etc. Dans une cinquième série de tubes nous avons mélangé du sang d'âne non immun, réparti à raison de 1 ml par tube, avec les différentes souches d'antigène. Après 18, 66 et 114 heures de contact, des repiquages ont été faits à partir de chaque tube contenant un mélange sang-antigène, à raison de 4 gouttes reportées dans 1 ml de bouillon-sérum. La croissance des organismes a été contrôlée tous les jours macroscopiquement et au microscope à contraste de phase.

b) Action bactéricide *in vitro* des sérums anti-*Mycoplasma* préparés sur ânes.

Nous nous sommes inspirés de la technique décrite par Edward et Fitzgerald (30) pour l'inhibition de la croissance sur milieu gélosé de P.P.L.O. par leurs antisérums homologues. Nos milieux gélosés, contenant de l'acétate de thallium et de la pénicilline, ont été additionnés de 2 ml de sérum de cheval stérile et de 1,5 ml des différents antisérums filtrés sur filtre Seitz EK. Deux gouttes d'une culture de 48 heures des différentes souches furent étalées sur des boîtes de Pétri de manière à ce que chaque souche cultivât en présence des différents antisérums.

Les antisérums III, V, XI, XII, 12, 35, 76, M, V, F, N et NIC furent utilisés pour cette partie de l'expérimentation.

## RESULTATS

### 1° Réactions d'agglutination.

Les résultats sont figurés dans le tableau 1 pour les agglutinations rapides sur lame, et le tableau 2 donne le titrage des agglutinines pour les différents antisérums et les différents antigènes. Certaines réactions n'ont pu être faites du fait d'une quantité insuffisante d'antigène. Les résultats obtenus sont similaires dans les deux tableaux, compte tenu du phénomène de zone et de la sensibilité plus grande du test d'agglutination en tube. Nous n'avons pas donné le résultat des agglutinations croisées en tube avec l'antisérum Vom, celui-ci ayant figuré dans un tableau d'une publication antérieure (9).

TABLEAU 1

Agglutininations croisées sur lame entre différents organismes du genre *Mycoplasma*

Antisérums préparés sur ânes	Antigènes															
	<i>M. mycoides</i> var. : <i>mycoides</i> <i>capri</i>				<i>M. laidlawi</i>								<i>M. bovigenitalium</i> <i>M. hominis</i>			
	T <sub>5</sub>	M	F	V	L	III	V	XI	XII	12	35	XV	76	106	N	NIC
M	++++	++++	++++	++++	-	++++	++++	++++	+++	+++	++++	NF	-	-	++++	++++
V	+++	+++	++++	++++	NF	+++	+++	+++	+++	++	+++	±	-	-	+++	+++
F	+	±	++++	±	NF	++++	+++	+++	+++	++	+++	NF	-	-	++++	++++
III	+++	-	+++	NF	NF	++++	++++	+	+	-	++	NF	-	NF	+++	+++
XI	-	-	-	-	-	++	-	++	++++	-	++	-	-	-	-	++++
XII	-	-	++	+++	-	++++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	++	+++
35	+++	+++	++	++++	++	++	++	++	+++	++	+++	-	±	-	+++	+++
76	++	+	++	NF	-	+++	++	++	+	-	++++	NF	++++	NF	-	-
Sérum de boeuf péri- pneumonique	++++	++++	+	+++	++	++++	++	++	++++	+	+++	-	-	-	+++	++++
Sérum d'âne normal (témoin)	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : agglutination négative. ± : agglutination très douteuse. NF : réaction d'agglutination non faite.  
+, ++, ... : agglutination positive, le nombre de croix indiquant l'intensité de la réaction.

## 2° Réaction de précipitation en milieu gélifié.

Nous avons essayé tous les systèmes antigène-anticorps possibles. Les résultats obtenus ont révélé toute une « mosaïque d'antigènes », selon le terme de Nicolle, qu'il a été possible de classer, en faisant alterner des antigènes différents dans les cupules et en incriminant un précipitogène commun lorsque celui-ci se traduisait, pour deux sources antigéniques distinctes, par une même ligne de précipitation continue. Ceci nous a conduit à adopter une classification arbitraire des précipitogènes que nous avons appelés : a, b, c, d, e, f, dans l'ordre de leur éloignement du réservoir d'antigène.

Cette étude nous a été facilitée par la richesse en différentes précipitines du sérum anti-35, qui permet de révéler 4 antigènes distincts a, b, c, d. Nous reprendrons en détail les résultats obtenus ; ils trouvent mieux leur place dans un autre travail (31) qui propose une base de classification sérologique des P.P.L.O. ; nous nous y sommes plus particulièrement attachés au morcelage des fractions antigéniques des germes du genre *Mycoplasma*, en les « disséquant » par des absorptions sélectives.

Nous pouvons dire cependant que *Mycoplasma mycoides* var. *capri* est constitué de deux antigènes au moins, et que *Mycoplasma mycoi-*

TABLEAU 2

## Titrage quantitatif des agglutinines des différents antisérums

Antisérums	Antigènes															
	M	T <sub>3</sub>	T	V	F	III	V	XI	XII	12	35	76	106	N	NIC	
M	640	320	320	10	10	2560	2560	320	40	2560	20	-	-	640	1280	
F	1	-	-	-	10	20	10	10	40	10	20	-	NF	20	1	
III	-	1	NF	NF	20	40	40	20	20	-	20	-	NF	20	10	
XI	-	-	NF	NF	1	1	-	1	1	-	1	-	NF	-	1	
XII	40	-	NF	NF	1	160	160	160	1	160	160	-	NF	160	80	
35	20	10	160	1	1	320	640	640	20	1280	640	-	1	320	80	
76	1	10	NF	NF	10	10	20	10	1	-	10	80	NF	1	1	
N	-	-	NF	NF	-	20	20	-	10	10	10	-	NF	80	20	
NIC	1	-	-	NF	-	20	10	20	1	10	80	-	NF	10	20	

- : Agglutination négative

NF : Réaction d'agglutination non faite.

Les titres agglutinants sont exprimés par l'inverse de la dilution plus élevée ayant donné encore une agglutination visible (dilution limite 1/2560);  
1 signifie sérum non dilué.

des var. *mycoides* renferment au minimum trois fractions antigéniques distinctes ce qui confirme les observations de White (28). *Mycoplasma laidlawi* souche 12 semble ne contenir que trois antigènes, alors que les souches III, V, XI, XII, 35, N et NIC contiennent au moins 4 antigènes. Quelques photographies illustrent les réactions de précipitation croisées qui ont été faites (les lignes de précipitation apparaissent en face des cupules renfermant l'antigène).

### 3° Action inhibitrice des anticorps sur la croissance des P.P.L.O.

#### a) Technique de Priestley modifiée avec les sangs d'ânes immunisés.

Seule *Mycoplasma laidlawi* souche XI eut sa culture nettement inhibée par le sang antihomologue.

Il est à remarquer cependant que la culture des autres souches, en présence de leur sang anti-35 ne put être vérifiée qu'au microscope, aucune opacité n'ayant troublé les bouillons de repiquage.

Mais nous avons été très surpris de constater que le sang anti-35 (la souche 35 est, rappelons-le, une souche génitale bovine de type « S ») exerçait une action bactéricide très nette sur les organismes de la péripneumonie bovine et de la pleuropneumonie contagieuse caprine. Une culture de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, souches T<sub>3</sub> et Maroua, est inactivée au contact du sang anti-35, en 18 heures au plus, ainsi que le montrent les repiquages en bouillon-sérum. Quelques organismes semblent cependant encore subsister, ainsi qu'en témoigne une très faible culture non visible macroscopiquement, mais

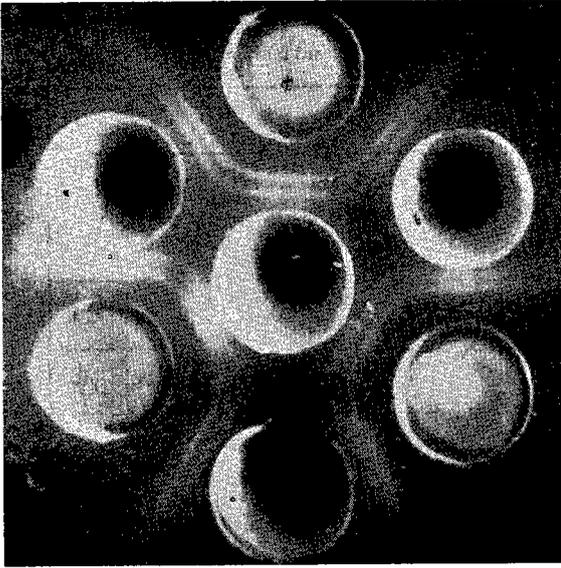


Fig. 1

Sérum anti-35 dans le réservoir central, et alterné avec l'antigène 35 dans les cupules périphériques.

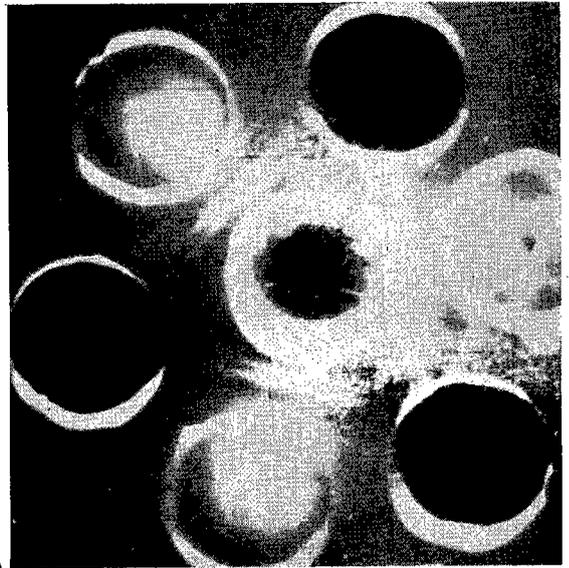


Fig. 2

Sérum anti-35 dans le réservoir central. Antigène NIC.

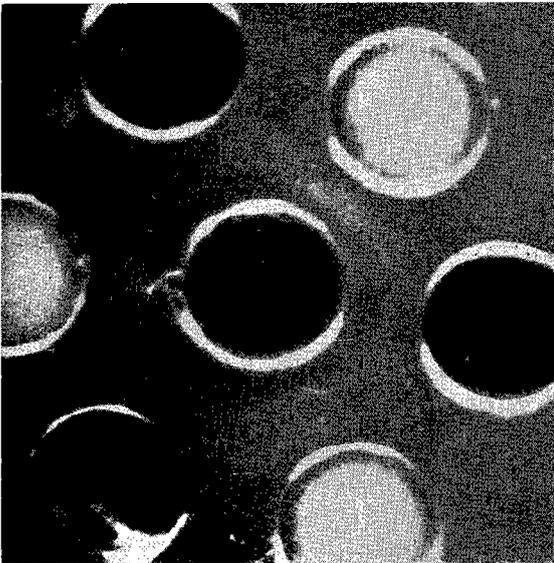


Fig. 3

Sérum anti-35 dans le réservoir central. Antigène XI.

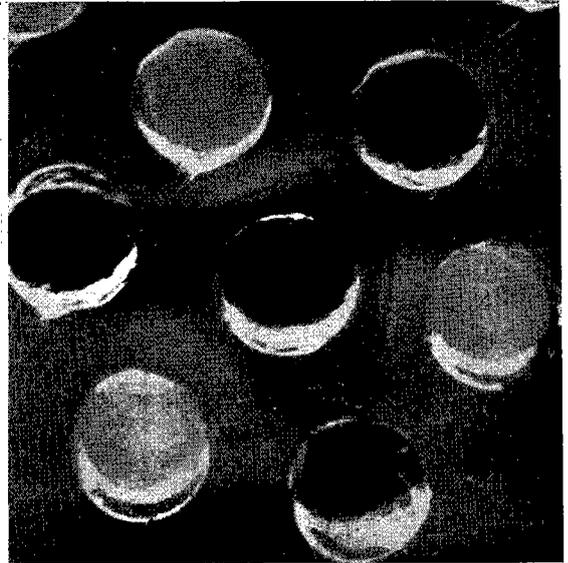


Fig. 4

Sérum anti-35 dans le réservoir central. Antigène XII.



Fig. 5

Sérum anti-XII dans le réservoir central.  
Antigène III.

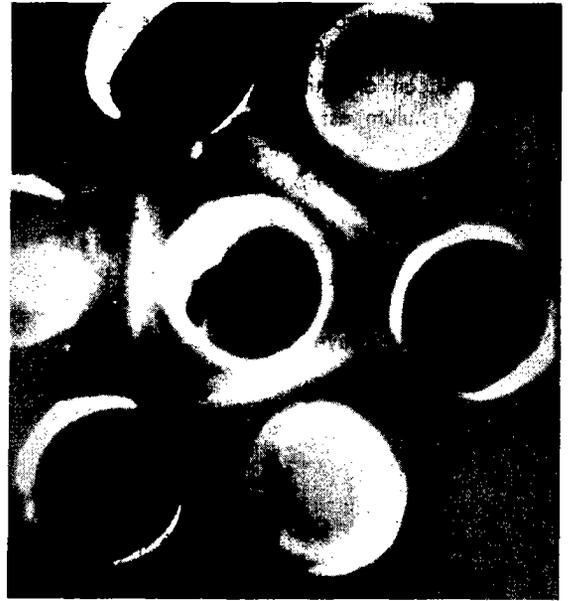


Fig. 6

Sérum anti-35 dans le réservoir central.  
Antigène III.

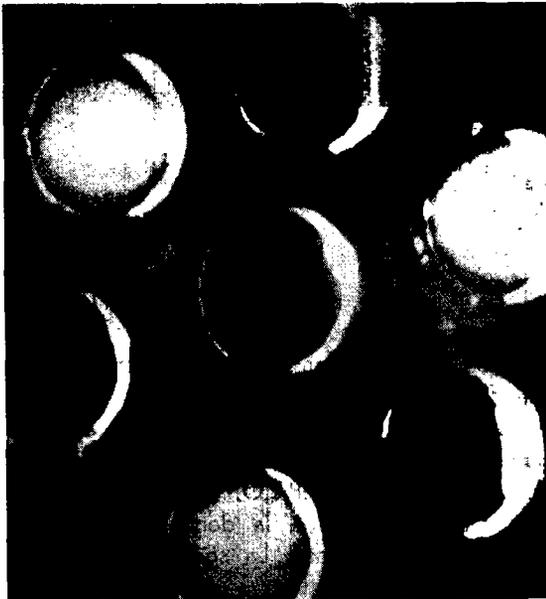


Fig. 7

Sérum anti-XII dans le réservoir central.  
Antigène XI.

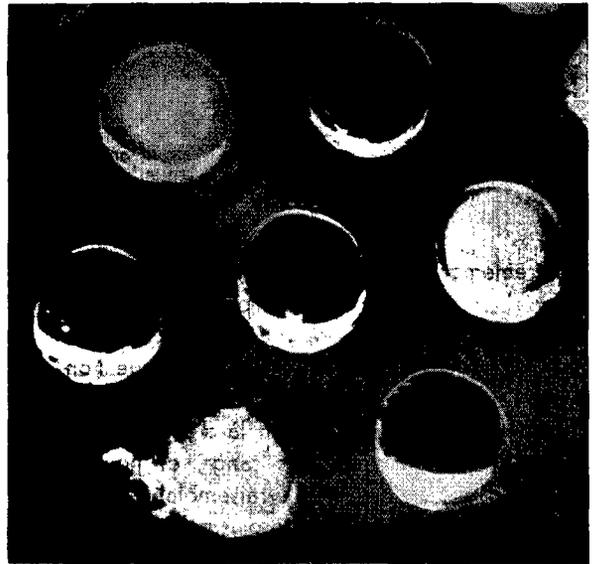


Fig. 8

Sérum anti-N dans le réservoir central.  
Antigène XI.

contrôlable au microscope à contraste de phase, lors des repiquages effectués après 66 heures de contact. Aucun organisme viable n'est retrouvé lorsque l'inoculum est resté en contact pendant 114 heures avec le sang anti-35.

L'inoculum de *Mycoplasma mycoides* var. *capri*, souche Farcha, est en grande partie lysé après un contact de 66 heures avec le sang anti-35, et a perdu toute viabilité après 114 heures de contact.

Nous avons relevé également l'observation

présence du sang anti-35 nous aurait paru moins spectaculaire, et nous n'aurions alors peut-être pas été conduits, comme cette expérimentation nous y a menés, à essayer la souche 35 comme souche vaccinale contre la péripneumonie, constatant ainsi une protection certaine mais qui semble de courte durée. Le tableau 3 résume les résultats obtenus avec les quatre sangs anti étudiés : XI, XII, 12 et 35. Nous soulignerons le fait que, dans ce tableau, toute culture macroscopique ou microscopique a été notée.

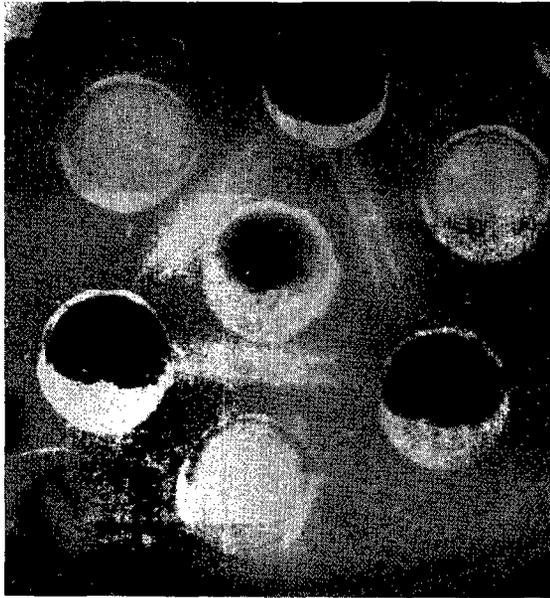


Fig. 9

Sérum anti-35 dans le réservoir central.  
Antigène N.

extrêmement curieuse d'une transformation, pour certaines souches, des corps élémentaires en « large bodies », après un contact de 66 heures avec leur sang anti, à tel point que l'on ne remarquait que ces dernières formes à l'examen microscopique. Il s'agit là d'une action nettement défavorisante des sangs, et non d'une action bactéricide. Il est vraisemblable qu'il eût été préférable de suivre de plus près la technique de Priestley, et d'utiliser une anse de culture pour ensemercer les tubes de sang et non 2 gouttes de culture. Nous aurions alors constaté sans doute des inhibitions plus nettes ; mais l'inhibition de la culture des souches M et F en

b) *Technique d'Edward modifiée avec le sérum d'ânes immunisés.*

Les résultats que nous a donnés cette technique furent extrêmement intéressants, car ils ont permis de compléter ceux que nous avons résumés dans le tableau 3. De plus l'inhibition de la croissance des P.P.L.O. a été appréciée plus facilement, grâce à la densité des colonies cultivant sur gélose. La souche que nous avons appelée 35 A est la souche *Mycoplasma laidlawi* 35 repassée 3 fois sur œuf embryonné, par voie vitelline, après les 20 passages sur bouillon-sérum qui ont suivi l'isolement, et repiquée 3 fois en bouillon-sérum après son adapta-

TABLEAU 3

Action bactéricide du sang d'ânes immunisés avec les souches XI, XII, 12 et 35 de Mycoplasma laidlawi sur différents Mycoplasma

Sérums anti		Souches																		
		<u>M. mycoides</u> var.				<u>M. laidlawi</u>								<u>M. bovisgenitalium</u>					<u>M. hominis</u>	
		<u>mycoides</u>		<u>capri</u>		L	III	V	XI	XII	12	35	XV	37	75	76	106	N	NIC	
	M	T <sub>3</sub>	F	V																
XI	Après 18 h.	+1	+2	+1	+1	+	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+3	+3	+3	+1	+1	
	Après 66 h.	+2	+1	+1	+1	+	+1	+2	+2	+1	+1	+1	+	+3	+3	+3	+3	+2	+2	
	Après 114 h.	+1	+1	+1	NF	+	+1	+1	-	+1	+1	+1	NF	NF	NF	NF	NF	+1	+1	
XII	Après 18 h.	+1	+2	+1	+1	+	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+3	+3	+3	+3	+1	+1	
	Après 66 h.	+2	+2	+1	+1	+	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+	+3	+3	+3	+3	+1	+1	
	Après 114 h.	+1	+1	+1	NF	+	+1	+1	NF	+1	+1	+1	NF	NF	NF	NF	NF	+1	+1	
12	Après 18 h.	+1	+1	+1	+1	+	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+3	+3	+3	+1	+1	
	Après 66 h.	+2	+1	+3	+3	+	+1	+1	+2	+1	+1	+1	+	+3	+3	+3	+4	+1	+1	
	Après 114 h.	+1	+1	+1	NF	+	+1	+1	+1	+2	+1	+1	NF	NF	NF	NF	NF	+1	+1	
35	Après 18 h.	-	-	+1	+1	+	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+	+3	+3	+3	+3	+1	+1	
	Après 66 h.	+5	+4	+4	+4	+	+2	+2	+2	+2	+1	+2	+	+3	+4	+3	+4	+1	+2	
	Après 114 h.	-	-	-	NF	+	+1	+1	+1	+1	+1	+1	NF	NF	NF	NF	NF	+1	+1	

+1 = culture après 24 heures d'incubation

+2 = culture après 2 jours d'incubation, etc...

- = pas de cultures

NF = non fait.

tion à l'œuf. Le tableau 4 collige les résultats : nous attirerons l'attention sur le fait qu'un anti-sérum préparé à partir de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* souche Maroua inhibe à un certain degré la colonisation de *Mycoplasma mycoides capri* souche Farcha. Le sérum anti-35

montre des propriétés bactéricides qui débordent le cadre des souches de *Mycoplasma laidlawi*; l'étude faite selon la technique d'Edward confirme en particulier le pouvoir inhibiteur de cet anti-sérum vis-à-vis de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*.

TABLEAU 4

Action inhibitrice d'antisérums, préparés sur ânes, sur la colonisation de différents Mycoplasma

Antisérums	Souches											
	<u>M. mycoides</u> var. :			<u>Mycoplasma laidlawi</u>							<u>M. hominis</u>	
	<u>mycoides</u>	<u>capri</u>		III	V	XI	XII	12	35	35 A	N	NIC
M	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
III	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XI	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
XII	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
12	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
35	-	-	+	+	+	±	+	±	-	-	±	±
76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
NIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

- + : colonisation dense sur toute la surface de la gélose  
 ± : colonisation moins dense par rapport à la colonisation type  
 - : inhibition totale de la culture.

Hormis la souche 12, les autres souches de *Mycoplasma laidlawi* étudiées semblent mal se prêter à la formation d'anticorps bactéricides dans l'organisme de l'âne.

## DISCUSSION

L'étude des caractères antigéniques des micro-organismes du genre *Mycoplasma* se montre riche d'enseignements. Les relations antigéniques existant entre *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, *Mycoplasma mycoides* var. *capri*, *Mycoplasma laidlawi*, et *Mycoplasma hominis*, dont

on ne trouve que des observations disparates faites par différents auteurs, sont ici confirmées. Il existe entre toutes ces souches, isolées d'une pathologie variée intéressant diverses espèces animales, une parenté qui fait penser à un phylum commun. Le fait que Dujardin-Beaumetz ait provoqué une réaction willemsienne sur la chèvre avec le germe de la péripneumonie, alors que les bovins restent insensibles au germe de la pleuropneumonie des chèvres, et les réflexions d'Edward (4), amènent à une conception uniciste ; *Mycoplasma mycoides* var. *capri* dériverait de *Mycoplasma mycoides* var.

*mycoïdes*. L'agent de la péripneumonie contagieuse des bovidés apparaîtrait comme représentant initial du genre *Mycoplasma*. La similitude antigénique qui existe entre la souche 35, isolée du tractus génital d'une vache zébu, et la souche péripneumonique virulente Maroua permet de se demander s'il n'existe pas une filiation directe de l'une à l'autre. Et si Freundt, au Danemark, s'est étonné d'avoir isolé deux souches de P.P.L.O. du tractus génital humain qui par leurs caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques ne pouvaient être différenciées de *Mycoplasma mycoïdes*, nous avons également été surpris de retrouver les mêmes résultats avec des souches humaines et bovines isolées sur un continent différent. Bien plus, si l'on veut bien songer aux phénomènes de mutation, de recombinaison génétique et de sexualité microbienne, toutes les combinaisons antigéniques deviennent possibles ; il n'y a qu'à penser aux *Salmonella* dont la liste s'allonge tous les mois.

Les P.P.L.O. occupent une position clé dans la systématique, véritable charnière entre les bactéries et les virus ; d'un côté le pas est franchi vers le pneumocoque par Kurotchin et Benardsky (33), et d'un autre côté la porte est ouverte sur le virus vaccinal par Heslop (34) et Provost (2). Alors que de nombreuses recherches ont été faites sur la biochimie de ces organismes et leur morphologie, trop rares sont les travaux portant sur l'architecture antigénique de ces germes qui nous livrera la solution des problèmes pratiques que pose le genre *Mycoplasma*. Trop de discussions tendent à faire converger les rapports existant entre les organismes L, germes « fabriqués » dans les laboratoires, gardant en totalité ou en partie les caractères antigéniques des bactéries dont ils dérivent, et les P.P.L.O., germes pathogènes responsables de lourds dommages économiques, ayant une structure antigénique propre. Déjà, la mise en évidence des communautés antigéniques des *Mycoplasma* et leur fréquence dans le tractus génital des zébus arabes du Tchad nous permettent de comprendre les fausses réactions positives que nous avons observées avec le test rapide d'agglutination sur lame. Longtemps l'autorité incontestée de Sabin a imposé une classification des P.P.L.O. basée sur les

espèces animales chez lesquelles s'exerçait leur pouvoir pathogène, ou dont ils avaient été isolés. Mais au fur et à mesure que de nouveaux P.P.L.O. furent trouvés, on rencontra au sein même d'une pathologie commune, sur une même espèce, des souches apparemment différentes. Un souci de synthèse et de clarté pousse à rechercher une classification ordonnée permettant la comparaison de deux souches appartenant à deux espèces différentes et le typage des nouvelles souches qui seront isolées.

## CONCLUSION

Par les réactions sérologiques croisées d'agglutinations, de précipitation en milieu gélifié, et par l'étude de l'action bactéricide des anticorps, des fractions antigéniques communes ont été mises en évidence entre différents germes du genre *Mycoplasma* appartenant aux espèces *mycoïdes*, (variétés *mycoïdes* et *capri*), *laidlawi*, *bovigenitalium* et *hominis*. Cette constatation permet la compréhension des fausses réactions positives que l'on peut avoir lors de l'utilisation en brousse du test d'agglutination rapide sur lame, sur des bovins hébergeant des P.P.L.O. pathogènes ou saprophytes dans leur tractus génital. Ces relations antigéniques communes à différents P.P.L.O. font penser à une filiation qui aurait pour chef de file *Mycoplasma mycoïdes*. L'intérêt mondial suscité depuis quelques années par les P.P.L.O. fait espérer qu'une classification sérologique des germes appartenant au genre *Mycoplasma* sera établie prochainement.

*Institut d'élevage et de médecine vétérinaire  
des pays tropicaux :*

*Laboratoire de recherches vétérinaires  
de Farcha, Fort-Lamy (Tchad).*

## BIBLIOGRAPHIE

1. LINDLEY (E.P.). — The rapid slide agglutination test in the control of contagious bovine pleuropneumonia in Nigeria. *Bull. epiz. Dis. Africa*, 1958, **6**, 369-371.

2. PROVOST (A.). — Relations sérologiques entre le virus vaccinal et *Mycoplasma mycoides*. *Rev. Elev. Méd. vét., Pays trop.*, 1958, 11 (1), 5-10.
3. PROVOST (A.), VILLEMOT (J.M.), QUEVAL (R.) et VALENZA (J.). — Les limites d'interprétation de la réaction d'agglutination sur lame dans le diagnostic de la péripneumonie. *Bull. epiz. Dis. Africa*, 1959. A paraître.
4. EDWARD (D.G.ff). — Organisms of the pleuropneumonia group causing disease in goats. *Vet. Rec.*, 1953, 65, 873-874.
5. DUJARDIN-BEAUMETZ (Ed.). — Transmission de la péripneumonie des bovidés aux espèces ovine et caprine. *Ann. Inst. Past.*, 1906, 20, 449.
6. KLIENERBERGER-NOBEL (E.). — Micro-organisms of the pleuropneumonia group. *Biol. Rev.*, 1954, 29, 154-184.
7. KLIENERBERGER-NOBEL (E.). — Communication personnelle, 1959.
8. LONGLEY (E.O.). — Contagious caprine Pleuro-pneumonia. *Colonial research publication N° 7*. His Majesty's Stationery office, London, 1951.
9. PROVOST (A.) et VILLEMOT (J.M.). — A propos du diagnostic de laboratoire de la pleuropneumonie contagieuse caprine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, 12 (1), 11-20.
10. CORDY (D.R.), ADLER (H.E.) et YAMAMOTO (R.). — A pathogenic P.P.L.O. from goats. *Cornell Vet.*, 1955, 45, 50-58.
11. LAWS (L.). — A pleuropneumonia-like organism causing peritonitis in goats. *Aust. Vet. J.*, 1956, 32 (12), 326-329.
12. GREIG (A.S.). — The isolation of pleuropneumonia-like organisms from the respiratory tracts of sheep. *Canad. J. Comp. Med.*, 1955, 19, 265-271.
13. DURUSAN (R.) et DÖGUER (M.). — Türkiyede kuzularin akciğerlerinden izole edilen plöropnömonia gurubuna dahil organizmlaren. *Türk. Vet. Hek. Dern. Deg.*, 1955, 25, 2217-2230.
14. BOIDIN (A.G.), CORDY (D.R.) et ADLER (H.E.). — A pleuropneumonia-like organism and a virus in ovine pneumonia in California. *Cornell Vet.*, 1958, 48, 410-430.
15. HEIKKILA (I.). — Pleuropneumonie infectieuse des moutons. *Bull. Off. intern. Epiz.*, 1956, 46, 585-591.
16. EDWARD (D.G.ff). — An investigation of pleuropneumonia-like organisms isolated from the bovine genital tract. *J. gen. Mic.*, 1950, 4, 4.
17. NICOL (C.S.) et EDWARD (D.G.ff). — Role of organisms of the pleuropneumonia group in human genital infections. *Brit. J. ven. Dis.*, 1953, 29, 141-150.
18. FREUNDT (E.A.). — Morphological and biochemical investigations of human pleuropneumonia-like organisms (*Micromyces*). *Acta Path. Microb. Scand.*, 1954, 34 (2), 127-144.
19. HUIJSAMS-EVERS (A.G.M.) et RUYLS (A.C.). — Microorganisms of the pleuropneumonia group in man. Serological identification and discussion of pathogenicity. *Antonie V. Leewenchock*, 1956, 22, 377-384.
20. KINGSBURY, cité par BORREL (L.J.). — Pleuropneumonia et bacteries en phase L. *Biol. Med.*, 1952, 41, 379-449.
21. VILLEMOT (J.M.) et PROVOST (A.). — Isolement au Tchad de P.P.L.O. génitaux d'origine bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, 12 (1), 5-10.
22. VILLEMOT (J.M.) et PROVOST (A.). — *Bull. Soc. Path. exo.*, à paraître.
23. PROVOST (A.) et QUEVAL (R.). — Recherches immunologiques sur la péripneumonie. I. La réaction d'agglutination. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1957, 10 (4), 357-368.
24. PIERCY (S.E.) et KNIGHT (G.J.). — The preparation, titration and challenge of avianised bovine pleuropneumonia vaccines. *Bull. epiz. Dis. Africa*, 1957, 5, 161-173.
25. MANJREKAR (S.L.), DHAKE (P.R.) et KULKARNI (V.B.). — The laboratory diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia. *Ind. Vet. J.*, 1958, 35 (1), 24.
26. MANSI (W.). — The study of some viruses by the plate gel diffusion precipitin test. *J. comp. Path.*, 1957, 67 (3), 297-303.

27. VILLEMOT (J.M.) et PROVOST (A.). — **Précipitation en milieu gélifié du virus rabique par le sérum rabique hyperimmun.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1958, **11** (4), 387-397.
28. WHITE (G.). — **Agar double diffusion precipitation applied to the study of *Asterococcus mycoides*.** *Nature* (London), 1958, **181**, 278.
29. PRIESTLEY (F.W.). — **Observations on immunity to contagious bovine pleuropneumonia, with special reference to the bactericidal action of blood.** *Brit. Vet. J.*, 1952, **108** (5), 153-161.
30. EDWARD (D.G.) et FITZGERALD (W.A.). — **Inhibition of growth of pleuropneumonia-like organisms by antibody.** *J. Path. Bact.*, 1954, **68** (1), 23-30.
31. VILLEMOT (J.M.) et PROVOST (A.). — **Bases d'une classification sérologique des P.P.L.O.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, **12** (4), à paraître
32. YAMAMOTO (R.) et ADLER (H.E.). — **Characterization of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. I. Antigenic analysis of 7 strains and their comparative pathogenicity for birds.** *J. infect. Dis.*, 1958, **102**, 143.
33. KUROCHKIN (T.J.) et BENARADSKY (C.V.). — **Serological diagnosis of bovine pleuropneumonia through the use of the specific carbohydrate of *Asterococcus mycoides*.** *Chin. Med. J.*, 1938, suppl. II., 269-278.
34. HESLOP (G.G.). — **Further researches into the serological diagnosis of C.B.P.P.** *J. Comp. Path.*, 1922, **35**, 1.

## SUMMARY

### Immunological research on pleuropneumonia.

**V - Antigenic Relations between *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, *Mycoplasma mycoides* var. *capri* and other micro-organisms of *Mycoplasma* genus.**

**(Author's Summary)**

By means of cross sero-agglutination tests, agar precipitation tests, and the study of the bactericidal action of antibodies common antigenic fractions of different organisms of the genus *Mycoplasma* belonging to *mycoides*, *laidlawi*, *bovigenitalium* and *hominis* species were detected. This finding shows why false positive reactions are sometimes encountered in the field when the rapid slide agglutination test is used with sera of bovines harbouring pathogenetic or saprophytic P.P.L.O. in their genital tracts. These antigenic relations, which are common to several P.P.L.O., show the relationship of the *Mycoplasma* sp. It is hoped that, owing to the world wide interest raised by P.P.L.O.s, a serological classification of the organisms belonging to the *Mycoplasma* genus will be established.

## RESUMEN

### Investigaciones inmunológicas sobre la perineumonía.

**V. Relaciones antigénicas entre *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, *Mycoplasma mycoides* var. *capri* y otros micro-organismos del género *Mycoplasma*.**

**(Conclusiones del autor)**

Por las reacciones serológicas cruzadas de aglutinación, de precipitación en medio gelificado y por el estudio de la acción bactericida de los anticuerpos fracciones antigénicas comunes han sido puestas en evidencia entre diferentes gérmenes del género *Mycoplasma* pertenecientes a las especies *mycoides*, *laidlawi*, *bovigenitalium* y *hominis*. Esta constatación permite la comprensión

de las falsas reacciones positivas que se pueden tener cuando la aplicación del test de aglutinación rápida sobre lámina en la selva, tiene lugar sobre bovinos que albergan P.P.L.O. patógenos o saprofiticos en su tracto genital. Estas relaciones antigénicas comunes a diferentes P.P.L.O. hacen pensar en un parentesco que tendrá por jefe de fila *Mycoplasma mycoides*. El interés mundial suscitado despues de varios años por los P.P.L.O. hace esperar que una clasificación serológica de los gérmenes pertenecientes al genero *Mycoplasma* sea establecida.