

Références

1. Olson KE. Symposium : Industry challenges to dairy cattle management in the 21st century. Economic, political, and global demands on the United States dairy industry. *J Dairy Sci* 1993 ; 76 : 3133-42.
2. Bigras-Poulin M. L'épidémiologie vétérinaire, une nouvelle science ? *Ann Med Vet* 1993 ; 137 : 401-5.
3. Tillon JP. Le vétérinaire et la réorganisation du marché des produits agricoles : un point de vue européen. *Med Vet Quebec* 1994 ; 24 : 27-30.
4. Morrow DA. Developing a herd health program. *Vet Med* 1963 ; 58 : 308-16.
5. Côté JF. Herd health practice. *Can Vet J* 1963 ; 4 : 181-4.
6. Blood DC, Morris RS, Williamson NB, Cannon CM, Cannon RM. A health program for commercial dairy herds. 1 : objectives and methods. *Aust Vet J* 1978 ; 54 : 207-15.
7. Pritchard WR. A changing world and a changing profession challenge veterinary medical education. *J Vet Med Educ* 1994 ; 21 : 119-23.
8. Morris RS. Assessing the economic value of veterinary services to primary industries. *Aust Vet J* 1969 ; 45 : 295-300.
9. Fetrow J, McClary D, Harman B, et al. Calculating selected reproductive indices : recommendations of the American Association of Bovine Practitioners. *J Dairy Sci* 1990 ; 73 : 78-90.
10. Ferguson JD, Galligan DT. Prostaglandin synchronization programs in dairy herds. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1993 ; 15 : 646-55.
11. Mialot JP, Leroy I. Bilan et suivi d'élevage chez les bovins. Quel avenir ? *Point Vet* 1993 ; 25 : 521-8.
12. Goodger WJ, Rupanner R. Historical perspective on the development of dairy practice. *JAMA* 1982 ; 180 : 1294-7.
13. Bouchard É, Bigras-Poulin M, DuTremblay D, Labrosse P. ASTLQ, Amélioration de la Santé des Troupeaux Laitiers du Québec, a project for the development of population medicine in dairy cattle. In : *Proceedings of the 6th ISVEE Symposium*. Ottawa, 1991 : 517-9.
14. Baillargeon P, Bigras-Poulin M, Bouchard É, DuTremblay D. Projet ASTLQ, Amélioration de la Santé des Troupeaux Laitiers du Québec. In : *Congrès conjoint OMVQ-ACMV 6-9 juillet 1992*. Québec, 1994 : 480-98.

Application d'outils de biologie moléculaire à certaines mycoplasmoses des ruminants

François Thiaucourt, Sophie Lorenzon, Armelle David

De nombreux mycoplasmes peuvent infecter les ruminants [1] ; certains sont des pathogènes *sensu stricto*, d'autres des pathogènes opportunistes et, enfin, certains sont considérés comme des saprophytes. Au sein de ces mycoplasmes, ceux appartenant à ce qu'on appelle le « groupe mycoïdes » sont tous pathogènes et représentent une menace certaine pour l'élevage, ce qui justifie des études approfondies. Ce groupe rassemble six espèces, ou sous-espèces, fortement apparentées entre elles, du point de vue de leurs caractères biochimiques, antigéniques ou génomiques [2-4]. Certaines souches de ce groupe sont pathogènes et à l'origine de maladies légalement réputées contagieuses dans de nombreux pays. Ainsi *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC est l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) [5] et *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* l'agent de la pleuropneumonie contagieuse caprine [6]. Les souches appartenant aux autres espèces, comme *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri* et *M. mycoides* subsp. *mycoïdes* LC, sont responsables de syndromes « MAKePS » (pour mammites, arthrites, kératites, pneumonies et

septicémies) chez les petits ruminants [7] alors que *M. sp.* type PG50 est souvent rencontré chez les bovins lors de mammites. Une autre espèce de mycoplasme, *M. agalactiae* qui n'appartient pas au « groupe mycoïdes », est également responsable de syndromes « MAKePS » chez les petits ruminants.

La PPCB est actuellement présente partout en Afrique, à l'exception de l'extrémité sud du continent. Elle sévit sous une forme enzootique en Afrique de l'Ouest, et on a pu constater, au cours des deux dernières années, une recrudescence de cette maladie dans l'est du continent, là où elle avait disparu et où les efforts de vaccination s'étaient relâchés. L'importance des maladies légalement réputées contagieuses tient non seulement aux pertes directes qu'elles occasionnent, mais aussi à la mise en péril de schémas de sélection et aux restrictions de circulation des animaux qu'elles justifient. Ainsi le Botswana a-t-il récemment appliqué des mesures draconiennes d'abattage afin de reconstituer un cheptel indemne de PPCB et continuer à exporter de la viande bovine vers les pays européens.

Difficultés du diagnostic

Le diagnostic des mycoplasmoses peut se heurter à plusieurs écueils. La culture de ces procaryotes sans parois nécessite des

F. Thiaucourt, S. Lorenzon, A. David : CIRAD-EMVT, Laboratoire Pathotrop, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France.

Tirés à part : F. Thiaucourt

milieux spéciaux qui ne sont pas d'un emploi courant. Certaines souches ont une croissance très lente, c'est notamment le cas de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*. Les surinfections par des bactéries peuvent également masquer la présence des mycoplasmes. Enfin, il n'est pas rare d'isoler plusieurs mycoplasmes à partir d'un même prélèvement et, le plus souvent, l'espèce ayant la croissance la plus rapide masque celle à croissance lente. L'identification est d'abord fondée sur les résultats de tests biochimiques, semblables à ceux utilisés pour les bactéries, mais dont seuls quelques-uns sont utilisables pour les mycoplasmes. D'autres tests, basés sur des réactions sérologiques avec des sérums hyperimmuns, sont indispensables [8]. La spécificité de ces sérums peut quelquefois être mise en doute [9], en particulier pour l'identification de sous-espèces. Étant donné toutes ces difficultés d'isolement et d'identification, on peut affirmer que l'impact des mycoplasmoses est actuellement sous-évalué, en particulier dans les pays en développement.

L'épidémiologie et la pathogénie de ces mycoplasmoses sont aussi très mal connues. Les mycoplasmes, dépourvus de paroi, sont très fragiles et rapidement inactivés dans le milieu extérieur. Dans ces conditions, la transmission se fait par contact direct d'un animal

malade à un animal sain. Jusqu'à présent, il n'a pas été établi si, après une infection, il pouvait exister des porteurs chroniques. Ce point est important car il est en relation avec le type de prophylaxie la mieux à même d'éradiquer une mycoplasmoses dans un élevage, voire dans un pays.

Électrophorèse des protéines en sel d'acrylamide

Les espèces du « groupe mycoïdes » semblent différer entre elles du point de vue de la diversité des souches : celles appartenant aux sous-espèces *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* SC et *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* semblent très homogènes, alors que celles appartenant aux sous-espèces *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoïdes* subsp. *capri* et *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC présentent une hétérogénéité remarquable, ainsi que *M. agalactiae*. Ces variations s'observent, par exemple, par la technique d'électrophorèse des protéines en gel d'acrylamide (figure 1) qui fournit des profils protéiques assez caractéristiques d'espèce mais qui permet aussi de

mettre en évidence des différences entre souches [10, 11]. Cette variabilité peut expliquer, dans certains cas, les confusions d'identification et les variations de tropisme que l'on peut observer entre des souches appartenant à une même espèce. Enfin, et pour compliquer encore une situation déjà bien confuse, il a été montré que les mycoplasmes pouvaient présenter, à la surface de leur membrane, des antigènes variables jouant certainement un rôle dans les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire [12].

Analyse par restriction enzymatique de l'ADN total

Actuellement, il est possible de mettre en évidence quelques différences entre des souches de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* SC par restriction enzymatique de l'ADN total [13]. Ces différences sont éventuellement liées au nombre et à la position de certaines séquences nucléotidiques appelées « séquences d'insertion », qui peuvent être mises en évidence par des techniques d'hybridation [14]. Cela

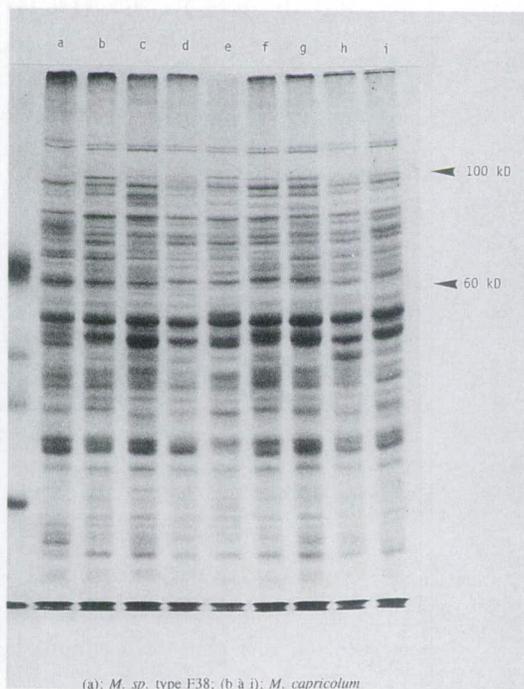


Figure 1. Profils protéiques, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, des souches de mycoplasmes appartenant à l'espèce *M. capricolum*. a : souche de la sous-espèce *capripneumoniae*; b à i : souches de la sous-espèce *capricolum*. Toutes ces souches présentent un profil globalement assez semblable, typique de l'espèce, mais les souches de la sous-espèce *capricolum* présentent des variations au niveau des bandes de poids moléculaire voisin de 100 kDa.

Figure 1. *Mycoplasma capricolum* whole cell protein patterns obtained by polyacrylamide gel electrophoresis. a : *capripneumoniae* subspecies strain ; from b to i, *capricolum* subspecies strains. All of these strains show a common species-specific pattern. However, there are differences within *capricolum* subspecies, notably around 100 kDa proteins.

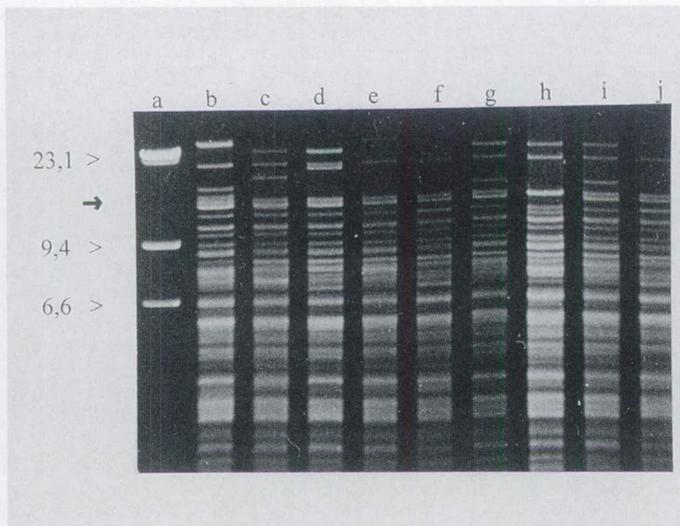


Figure 2. Profils de restriction, par *Hind* III, de l'ADN génomique de souches de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. a : marqueurs de poids moléculaires (exprimés en kbases). Origine des souches : b : KH3J (souche vaccinale) ; c : Sénégal ; d : Italie, ; e : T1/44 (souche vaccinale) ; f : Mauritanie ; g : Tanzanie ; h : Cameroun ; i : Namibie ; j : Tchad. Les différences sont très visibles pour les bandes de poids moléculaire compris entre 9,4 et 23,1 kb. La flèche indique les deux bandes qui permettent de distinguer la souche vaccinale KH3J (b) de la souche T1/44 (e).

Figure 2. *Hind* III restriction profiles of genomic DNA from strains belonging to the *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC biotype. a : molecular weight markers (in kb). Strain origins : b : KH3J (vaccinal strain), c : Senegal, d : Italy, e : T1/44 (vaccinal strain), f : Mauritania, g : Tanzania, h : Cameroon, i : Namibia, j : Chad. There were clear differences within the 9.4-23.1 kb range. The arrow points out the two bands that differentiate the vaccinal strain KH3J (lane b) from the T1/44 strain (lane e).

nécessite, jusqu'à présent, l'isolement de la souche pour pouvoir récolter l'ADN génomique total. Cette technique est donc réservée à des laboratoires de recherche. Elle mérite d'être signalée car c'est la première fois que des différences entre souches de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC ont pu être mises en évidence et qu'une corrélation a pu être démontrée avec l'origine géographique des souches. Ainsi, il semble établi que les souches isolées en Europe sont bien différentes de celles isolées en Afrique [13, 14]. En utilisant d'autres enzymes, nous avons pu affiner la distinction entre les souches et montrer que les souches vaccinales T1/44 et KH3J étaient clairement différenciables (figure 2). L'objectif est maintenant d'obtenir des amorces spécifiques de ces souches qui permettraient une identification directe des souches vaccinales par la réaction de polymérisation en chaîne sans avoir à les cultiver.

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction d'amplification génique, plus connue sous son sigle anglais de PCR, permet de résoudre une partie des difficultés du diagnostic. Il est en effet possible d'amplifier des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir d'échantillons conservés séchés, sur des morceaux de papier filtre par exemple. Cela ouvre de nouvelles perspectives aux pays tropicaux qui n'ont quelquefois pas les moyens de maintenir une chaîne du froid entre la collecte des échantillons et la mise en culture au laboratoire [15]. L'amplification des gènes codant pour les ARN ribosomiaux fournit, en général, un diagnostic spécifique d'espèce [16, 17]. En effet, ces gènes sont relativement conservés et il est possible d'utiliser des

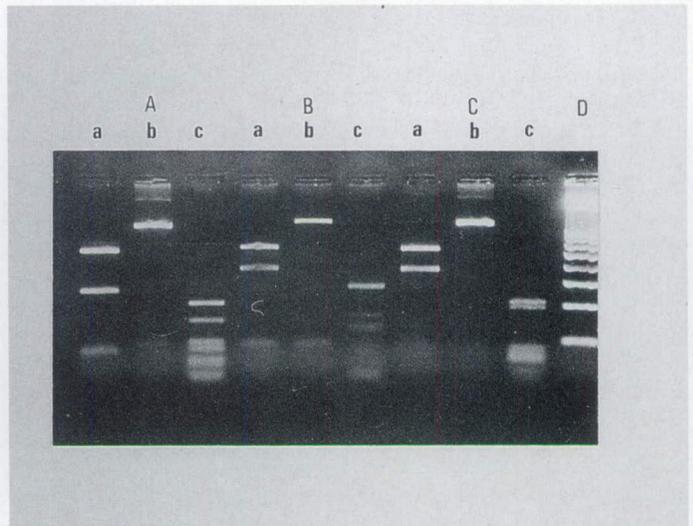


Figure 3. Mise en évidence de différences entre souches appartenant à l'espèce *M. capricolum* par PCR, suivie d'une digestion enzymatique des produits d'amplification. A : souche appartenant à la sous-espèce *capripneumoniae* ; B et C : deux souches appartenant à la sous-espèce *capricolum* ; D : marqueurs de poids moléculaires. Pour chaque souche, b représente le produit d'amplification de taille constante quelle que soit la souche ; a représente les produits de digestion par l'enzyme *Alu* I et c les produits de digestion par l'enzyme *Mse* I. Les différences observées pour les trois souches reflètent les différences de séquence du produit d'amplification et permettent de conclure à l'existence de trois souches distinctes.

Figure 3. Distinction of *M. capricolum* strains by PCR and enzymatic restriction of the amplified product. A : *capripneumoniae* subspecies strain, C and D : two *capricolum* subspecies strains, D : molecular weight markers. For each strain, a and c : show the results of *Alu* I and *Mse* I restriction of the amplified product. Size differences in the restriction products are correlated with sequence differences in the amplified product, indicating that these three strains are distinct.

amorces qui sont communes à l'ensemble des souches d'une même espèce, tout en étant spécifiques de cette espèce. Cependant, les souches du « groupe mycoïdes » sont tellement proches d'un point de vue phylogénétique que cette méthode ne peut distinguer entre elles les sous-espèces de ce groupe [18, 19]. L'identification peut éventuellement être obtenue par digestion enzymatique des produits d'amplification [20], comme cela a été proposé pour *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* [21]. Le diagnostic de la PPCC a ainsi été obtenu par la réaction de polymérisation en chaîne, au Tchad en 1994, avant que la confirmation formelle ne vienne, quelques semaines plus tard, par isolement et identification classique. D'autres auteurs ont proposé des réactions de PCR spécifiques de certaines sous-espèces à partir de portions de gènes dont la fonction est encore inconnue. Cela a été réalisé pour *M. mycoides*

subsp. *mycoides* SC, l'agent de la PPCB [22], mais aussi pour *M. agalactiae* [23]. Cette approche a le mérite d'offrir plus de sécurité, dans la mesure où l'amplification est spécifique de l'agent pathogène et où l'identité est, cette fois-ci, confirmée par digestion enzymatique.

Il est maintenant envisageable d'obtenir, grâce à la technique de PCR, des outils d'épidémiologie moléculaire des souches du « groupe mycoïdes ». Le principe de cette recherche est assez simple. Il s'agit d'identifier des fragments de gènes, communs à l'ensemble des souches de ce groupe, qui présentent ponctuellement une variabilité assez grande pour pouvoir différencier les souches entre elles. Dans un laboratoire de diagnostic, les variations entre souches peuvent être mises en évidence par digestion enzymatique du fragment amplifié (figure 3), et dans un laboratoire de recherche par séquençage de l'ensemble du fragment afin de le comparer aux autres. Un gène potentiellement utilisable a déjà été identifié à partir du génome de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, l'agent de la PPCC. Cependant, les difficultés pratiques subsistent. La principale d'entre elles tient à la variabilité qui existe au sein du « groupe mycoïdes » et, donc, à la difficulté d'avoir des amorces capables d'amplifier un fragment d'ADN pour l'ensemble des souches. La seule approche rationnelle consiste à séquencer, au moins partiellement, les gènes homologues d'un ensemble de souches représentatives de chaque sous-espèce, ce qui se fait actuellement.

À terme, ce n'est plus seulement l'espèce de mycoplasme qui sera identifiée mais aussi la souche en cause. L'isolement d'une même souche, à plusieurs années d'intervalle dans un élevage, sera la preuve de l'existence de porteurs chroniques non détectés. Au contraire, l'isolement de souches différentes signera une contamination d'origine extrinsèque. Selon les résultats les plus fréquents, les prophylaxies pourront ainsi être adaptées. Les spectaculaires progrès de la biologie moléculaire vont sans doute permettre des diagnostics plus rapides et plus fiables des espèces mycoplasmiques, voire même de caractériser les souches elles-mêmes. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la lutte contre les maladies contagieuses dépend moins de progrès techniques que de l'application de

mesures sanitaires cohérentes. Cette cohérence est assurée par la définition d'une politique qui puisse être acceptée par les éleveurs et qui ne soit pas d'un coût prohibitif. Des exemples historiques ont prouvé qu'il n'était pas nécessaire de pouvoir identifier les agents infectieux pour éradiquer des maladies contagieuses. La mise au point d'outils de diagnostic n'est donc pas strictement indispensable, mais elle doit permettre de minimiser les coûts des campagnes de lutte et, ainsi, rendre plus facile la réussite de ces campagnes ■

Remerciements

Les travaux concernant le « groupe mycoïdes » ont pu être effectués au CIRAD-EMVT grâce à des financements européens (projet CCPP, INCO-DC CT95-0007 et COST 826) et de l'AUPELF-UREF (X/1.20.07/94.07.2).

Références

1. DaMassa AJ, Wakenell PS, Brooks DL. Mycoplasmas of goats and sheep. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4 : 101-13.
2. Bonnet F, Saillard C, Bove JM, Leach RH, Rose DL, Cottew GS, Tully JG. DNA relatedness between field isolates of *Mycoplasma* F38 group, the agent of contagious caprine pleuropneumonia, and strains of *Mycoplasma capricolum*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43 : 597-602.
3. Christiansen C, Ernø H. Classification of the F38 group of caprine mycoplasma strains by DNA hybridization. *J Gen Microbiol* 1982; 128 : 2523-6.
4. Cottew GS, Breard A, Damassa AJ, et al. Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr J Med Sci* 1987; 23 : 632-5.
5. Nocard E, Roux E. Le microbe de la péripneumonie. *Ann Inst Pasteur* 1898; 12 : 240-62.
6. Perreau P, Cabaret J. Les affections parasitaires et bactériennes de l'appareil respiratoire de la chèvre. *Les colloques de l'INRA* N° 28 Niort. 1984; 297-335.
7. Thiaucourt F, Bölske G. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Scientific and Technical Review of the OIE* 1996; 15 (4) : 1397-414.
8. Al-Aubaidi JM, Fabricant J. Characterization and classification of bovine mycoplasma. *Cornell Vet* 1971; 61 : 490-518.
9. Stalheim OHV, Cottew GS, Freundt EA, Koski TA, Leach RH, Perreau P, Stone SS. Standard antisera produced in ponies for the identification of bovine mycoplasmas : comparative growth-inhibition results from six laboratories. *Am J Vet Res* 1983; 44 : 1898-900.
10. Costas M, Leach RH, Mitchelmore DL. Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *J Gen Microbiol* 1987; 133 : 3319-29.
11. Thiaucourt F. *La pleuropneumonie contagieuse caprine : de l'observation clinique à la mise au point de techniques de diagnostic*. Thèse. Université Paris XII-Val-de-Marne 1994; 347 p.
12. Baseggio N, Glew MD, Markham PF, Whithair KG, Browning GF. Size and genomic location of the pMGA multigene family of *Mycoplasma gallisepticum*. *Microbiology* 1996; 142 : 1429-35.
13. Poumarat F, Solsona M. Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* biotype Small Colony, the agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet Microbiol* 1995; 47 : 305-15.
14. Cheng X, Frey J, Poumarat F, Regalla J, Thiaucourt F, Nicolet J. Molecular epidemiology and short term evolution of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC using the insertion element IS 1296. *Microbiology* 1995; 141 : 3221-8.
15. Lefèvre PC, Blancou J, Dedieu L, Diallo A, Libeau G, Thiaucourt F. Field diagnostic kits : a solution for developing countries ? *Rev Sci Tech Off int Epiz* 1993; 12 : 451-60.
16. Johansson KE. Detection and identification of mycoplasmas with diagnostic DNA probes complementary to ribosomal RNA. In : Kahane I, Adoni A, eds. *Rapid diagnosis of mycoplasmas*. New York : Plenum Press, 1993 : 139-54.
17. Mattsson JG, Guss B, Johansson KE. The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol Letters* 1994; 115 : 325-8.
18. Pettersson B, Johansson KE, Uhlen M. Sequence analysis of 16S rRNA from mycoplasmas by direct solid phase DNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 : 2456-61.
19. Pettersson B, Leitner T, Ronaghi M, Bölske G, Uhlén M, Johansson KE. The phylogeny of the mycoïdes cluster. *J Bacteriol* 1996; 178 : 4131-42.
20. Bashiruddin JB, Taylor TK, Gould AR. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6 : 428-34.
21. Bascuñana CR, Mattsson JG, Bölske G, Johansson KE. Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J Bacteriol* 1994; 176 : 2577-86.
22. Dedieu L, Mady V, Lefèvre PC. Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. (Contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet Microbiol* 1994; 99 : 191-203.
23. Dedieu L, Mady V, Lefèvre PC. Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. *FEMS Microbiol Letters* 1995; 129 : 243-50.