

DK 10940

BA 514 366

CIRAD-EMVT
Campus de Baillarguet
B.P. 5035
34032 MONTPELLIER Cedex 1

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

MEMOIRE DE STAGE

RECHERCHE DE MARQUEURS D'EPIDEMIOLOGIE
MOLECULAIRE POUR LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE
BOVINE (PPCB) ET LA PLEUROPNEUMONIE CONTAGIEUSE
CAPRINE (PPCC) PAR RESTRICTION ENZYMATIQUE DE
PRODUITS D'AMPLIFICATION EN CHAINE PAR LA
POLYMERASE (PCR)

par

Cédric LE BAS

Année universitaire 1998-1999

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet



000001119

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

RECHERCHE DE MARQUEURS D'EPIDEMIOLOGIE
MOLECULAIRE POUR LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE
BOVINE (PPCB) ET LA PLEUROPNEUMONIE CONTAGIEUSE
CAPRINE (PPCC) PAR RESTRICTION ENZYMATIQUE DE
PRODUITS D'AMPLIFICATION EN CHAINE PAR LA
POLYMERASE (PCR)

par

Cédric LE BAS

Lieu de stage : Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

Organisme d'accueil : CIRAD-EMVT

Période de stage : du 1er au 20 décembre 1999

Rapport présenté oralement le : 26 janvier 2000

SOMMAIRE

Résumé	6
Mots-clés	6
Remerciements	7
Abréviations	8
INTRODUCTION	9
<i>Première partie : Partie bibliographique</i>	<i>10</i>
I. LA PÉRIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE (PPCB) ET LA PLEUROPNEUMONIE CONTAGIEUSE CAPRINE (PPCC), DEUX EPIZOOTIES CAUSÉES PAR DEUX MYCOPLASMES	10
1. Définitions	10
2. Clinique	10
3. Epidémiologie	10
3-1. Répartition géographique	10
3-2. Transmission	13
4. Isolement de l'agent étiologique	13
5. <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> (MmmSC) et <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i> (Mccp), deux mycoplasmes membres du "groupe Mycoides"	13
II. EPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA PPCB ET DE LA PPCC	15
1. Définition	15
2. Intérêts et applications de l'épidémiologie moléculaire	15
3. Les techniques appliquées à l'épidémiologie moléculaire de la PPCB et de la PPCC	16
3-1. Introduction	16
3-2. Techniques phénotypiques	16
3-2-1. <i>Caractères morphologiques et biochimiques</i>	16
3-2-2. <i>Tests immunologiques</i>	17
3-2-3. <i>Les profils protéiques</i>	17
3-2-4. <i>Les anticorps monoclonaux (Mabs)</i>	19
3-2-5. <i>Conclusion</i>	19
3-3. Techniques génotypiques	19
3-3-1. <i>Restriction enzymatique de l'ADN total</i>	19

3-3-2. Restriction enzymatique de l'ADN total couplée à une hybridation	24
3-3-3. PCR	26
3-3-4. Séquençage	29
III. LA RESTRICTION ENZYMATIQUE (REA) DE PRODUITS DE PCR	38
1. Principe	38
2. Intérêts	38
3. Domaines d'application	38
3-1. Diagnostic	38
3-2. Epidémiologie moléculaire	39

Deuxième partie : Partie expérimentale 40

I. INTRODUCTION	40
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	40
1. Amplification en chaîne par la polymérase, "Polymerase Chain Reaction" (PCR)	40
1-1. Souches étudiées.....	40
1-2. Conditions de culture	40
1-3. Extraction de l'ADN.....	40
1-4. Réactifs.....	41
1-5. Préparation des mélanges réactionnels.....	44
1-6. Ajout de l'ADN	45
1-7. Amplification.....	45
1-8. Révélation des produits de PCR par électrophorèse.....	46
1-9. Ré-amplification.....	46
2. Analyse par restriction enzymatique, "Restriction Enzyme Analysis" (REA)	47
2-1. Estimation de la quantité d'ADN.....	47
2-2. Enzymes utilisées	47
2-3. Préparation des mélanges réactionnels	47
2-4. Ajout des produits PCR.....	48
2-5. Digestion enzymatique	48
2-6. Electrophorèse	48
3. Séquençage.....	48
III. RÉSULTATS	48
1. PCR	48
2. REA	49
3. Séquençage.....	49

IV. DISCUSSION	65
1. PCR	65
2. REA	65
3. Séquençage	68
CONCLUSION.....	69
BIBLIOGRAPHIE.....	71
ANNEXES	76
ANNEXE 1 : Culture de mycoplasme et extraction d'ADN total	76
ANNEXE 2 : Mélange réactionnel des dNTP utilisés en PCR.....	77
ANNEXE 3: Séquence des oligonucléotides utilisés comme amorce pour l'amplification par PCR des fragments a, b et c (livrés par Genset SA).....	77
ANNEXE 4 : Protocole d'utilisation de l'Expand™ Long Template	78
ANNEXE 5 : Différents gels utilisés pour l'électrophorèse de fragments d'acide nucléique.....	79
ANNEXE 6 : Réactifs utilisés en électrophorèse	80
ANNEXE 7 : Enzymes utilisées pour la restriction enzymatique	81
ANNEXE 8 : Kit de purification des produits PCR en vue du séquençage	85
ANNEXE 9 : Marqueurs de poids moléculaire utilisés en électrophorèse.....	86
ANNEXE 10 : Provenance des différents réactifs utilisés en PCR.....	87
Liste des figures.....	88
Liste des tableaux	89

Résumé et mots-clés

Résumé

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) et la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) sont deux épizooties causées par deux mycoplasmes : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (*MmmSC*) et *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*). L'épidémiologie moléculaire de ces deux agents pathogènes a déjà été étudiée à l'aide de nombreuses techniques. Ce sont les techniques génotypiques qui sont le plus utilisées aujourd'hui, parce qu'elles permettent l'analyse de toutes les parties du génome, y compris les zones non codantes. Nous avons choisi deux méthodes pour la recherche de marqueurs d'épidémiologie moléculaire de la PPCB et de la PPCC : la restriction enzymatique de produits d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR-REA) et le séquençage. La première a permis de confirmer le polymorphisme d'une portion de 2,2 kb du génome de *MmmSC* : la souche burkinabe 87-137-10 a présenté un profil de restriction différent des souches KH3J et 8740, avec les enzymes *Hinf* I et *Mae* I. D'autre part, aucune variabilité n'a été observée pour le pseudo-gène *lppA* entre trois souches de *Mccp*, autant par PCR-REA que par le séquençage de 628 pb de ce pseudo-gène. Cette portion du génome de l'agent de la PPCC ne semble donc pas comporter suffisamment de polymorphisme pour être utilisée comme marqueur d'épidémiologie moléculaire. Les résultats obtenus et leur validation par le séquençage montrent que la PCR-REA est une technique fiable, simple, rapide et facilement applicable dans les pays en développement pour des études d'épidémiologie moléculaire.

Mots-clés

PPCB, PPCC, mycoplasme, *MmmSC*, *Mccp*, marqueur, épidémiologie moléculaire, restriction enzymatique, REA, RFLP, PCR, PCR-REA, séquençage, *lppA*.

Remerciements

Je tiens à remercier,

L'équipe de bactériologie et particulièrement Sophie Lorenzon pour son aide précieuse au laboratoire, sa patience et sa disponibilité. Merci également aux autres personnes du programme Santé Animale qui m'ont aidé et soutenu.

Pascal Hendrikx pour la réalisation des cartes de ce mémoire et pour ses encouragements ainsi que Laure Guérini pour sa collaboration en matière de SIG.

Les personnes de la bibliothèque, en particulier Marc Malmejean que j'ai beaucoup sollicité, pour leur efficacité et leur gentillesse.

Les organisateurs (trices) du DESS et responsables de la formation : Gérard Duvallat pour son accueil et le temps passé au téléphone, Brigitte Languedocq et Christine Gerbaud pour leur gentillesse, Marie-Caroline Estienne pour sa bonne humeur et son soutien pendant les foulées du cirad.

Les correcteurs de ce mémoire et membres du Jury : Laurence Dedieu, Christian Meyer, François Thiaucourt et Pascal Hendrikx.

Mes amis (es), bien sûr...

Abréviations

PPCB : péripneumonie contagieuse bovine

PPCC : pleuropneumonie contagieuse caprine

MmmSC : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony

MmmLC : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Large Colony

Mmc : *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*

Mcc : *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*

Msp.gr7 : *Mycoplasma* sp. groupe 7

Mccp : *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*

subsp. : subspecies (sous-espèce)

sp. : species (espèce)

OIE : Office International des Epizooties

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture)

PANVAC : Pan-African Veterinary Vaccine Center (Centre Panafricain de production de Vaccins Vétérinaires)

PARC : Pan-African Rinderpest Campaign (Campagne Panafricaine de lutte contre la Peste bovine)

Mabs : Monoclonal antibodies (anticorps monoclonaux)

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dTTP : désoxythymidine triphosphate

dGTP : désoxyguanine triphosphate

dCTP : désoxycytosine triphosphate

PCR : Polymerase Chain Reaction

REA : Restriction Enzyme Analysis (analyse par restriction enzymatique)

IS : Insertion Sequence, séquence d'insertion

PM : Poids moléculaire

pb : paires de bases

kb : kilobases

mM : millimolaire

INTRODUCTION

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) et la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) sont deux maladies infectieuses majeures occasionnant de lourdes pertes dans les cheptels bovins et caprins. La PPCB, inscrite sur la liste A de l'Office International des Epizooties (OIE), est actuellement en forte recrudescence en Afrique : Elle est apparue ces dernières années dans des pays antérieurement indemnes, touchant la Zambie en 1998, la Tanzanie en 1990, le Rwanda en 1994 et la République Démocratique du Congo en 1992. Son incidence augmente considérablement dans les zones d'enzootie, essentiellement depuis l'arrêt de la vaccination mixte peste bovine/PPCB. Il est donc urgent de disposer de nouveaux moyens de diagnostic et de prophylaxie pour contrôler la progression de cette épizootie.

Un volet important de la recherche sur la PPCB est représenté par l'épidémiologie moléculaire. Cette discipline s'appuie sur les techniques de biologie moléculaire pour étudier la diversité génétique microbienne. Elle comporte trois applications principales : • Le suivi épidémiologique par le typage des souches • La taxinomie microbienne avec l'appui de la phylogénie • La compréhension de la pathogénie et des relations hôte/parasite (Tibayrenc, 1998a). L'objectif de cette étude est principalement de répondre au premier point.

En premier lieu, nous présenterons succinctement la PPCB et la PPCC, ainsi que les techniques utilisées pour l'épidémiologie moléculaire de ces deux épizooties. Dans un deuxième temps, nous choisirons deux méthodes de recherche de marqueurs d'épidémiologie moléculaire : la restriction enzymatique de produits d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR-REA) et le séquençage. La PCR-REA a déjà été appliquée à l'identification de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (*MmmSC*), l'agent de la PPCB, ou de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*), l'agent de la PPCC. Toutefois, cette technique n'a encore jamais été utilisée pour la discrimination des souches de ces deux agents pathogènes. L'utilisation du séquençage est intéressante pour valider les résultats obtenus avec la PCR-REA.

Nous pensons ainsi tester une portion de 2,2 kb du génome de *MmmSC* et une portion de 1,68 kb du pseudo-gène *lppA* de *Mccp* : En effet, ces deux fragments génomiques ont révélé un certain polymorphisme au cours de récentes études. Nous espérons vérifier ces hypothèses sur trois souches de *MmmSC/Mccp* d'origines distinctes et connues pour leur variabilité.

Première partie : Partie bibliographique

I. LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE (PPCB) ET LA PLEUROPNEUMONIE CONTAGIEUSE CAPRINE (PPCC), DEUX EPIZOOTIES CAUSEES PAR DEUX MYCOPLASMES

1. Définitions

◇ La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est une maladie infectieuse, contagieuse, affectant uniquement les bovidés et causée par un mycoplasme : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (*MmmSC*) (Cottew et Yeats, 1978).

◇ La pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) est une maladie infectieuse, contagieuse, affectant uniquement la chèvre et également causée par un mycoplasme : *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) (Leach *et al.*, 1993), anciennement dénommé *Mycoplasma sp.* type F38 (Macowan et Minette, 1976).

2. Clinique

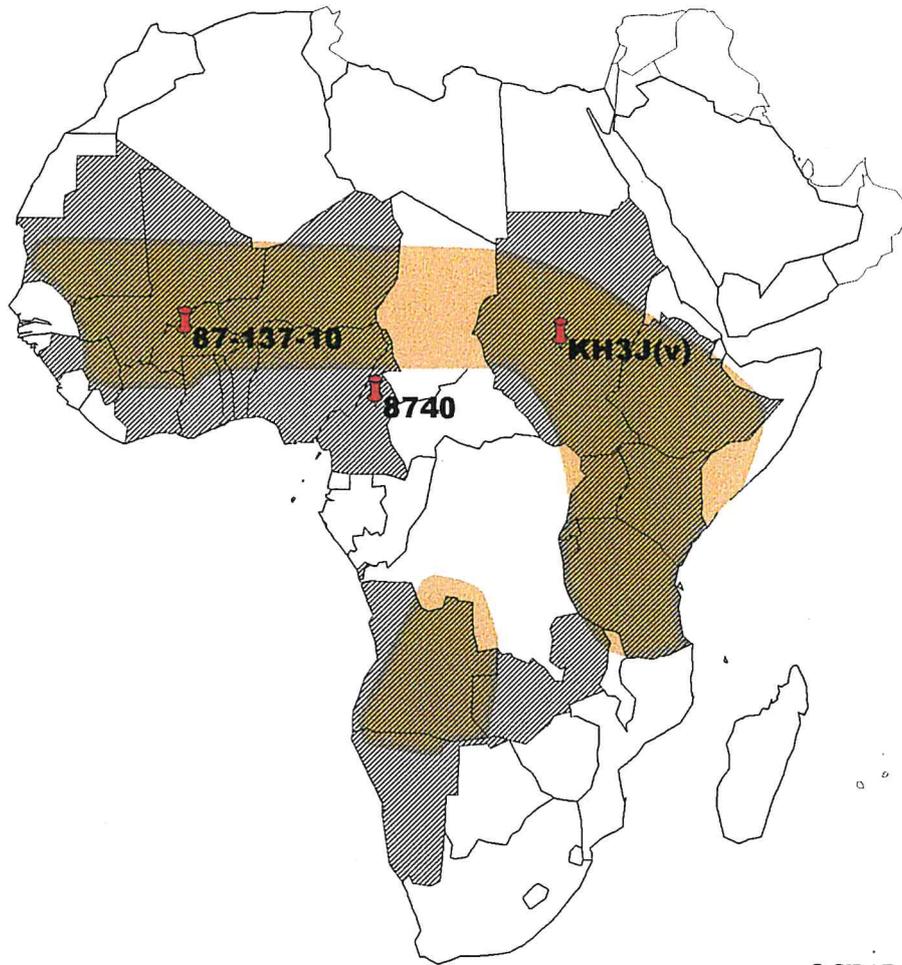
Dans leur expression clinique, la PPCB et la PPCC sont très similaires. Dans les formes aiguës facilement reconnaissables, les symptômes respiratoires prédominent et sont très marqués : jetage, respiration accélérée, pénible, entrecoupée d'accès de toux douloureux. La détresse respiratoire se reconnaît à la position typique des antérieurs écartés. A ce stade, les animaux n'ont plus la force de s'abreuver et de s'alimenter. Ils restent prostrés, ne peuvent plus se déplacer et finissent par demeurer en position de décubitus. La mort survient en absence de traitement dans environ 25 à 45 % des cas pour la PPCB (Curasson, 1942) et dans 60 à 100 % des cas pour la PPCC (Thiaucourt, 1994).

3. Epidémiologie

3-1. Répartition géographique

◇ L'aire de répartition actuelle de la PPCB s'étend à l'Afrique subsaharienne y compris la corne de l'Afrique et à une partie de l'Afrique Australe centrée sur l'Angola. En 1999, 21 pays africains ont déclaré la PPCB à l'Office International des Epizooties, l'OIE (figure 1 ; (Masiga *et al.*, 1996 ; O.I.E., 1999). En Europe, la PPCB est officiellement présente au Portugal. L'Espagne ne déclare plus de foyer depuis avril 1994 et l'Italie depuis mars 1993. En France, la maladie était réapparue en 1967 dans le département des Pyrénées-Orientales. Les derniers foyers ont été déclarés en 1984.

◇ Actuellement, *Mccp* a été isolé dans les pays suivants : le Kenya, l'Ethiopie, l'Ouganda, le Soudan, le Tchad, le Niger, la Tunisie, Oman, les Emirats Arabes Unis, la Turquie, le Yemen et récemment en Tanzanie. De plus, la PPCC a été cliniquement décrite en Algérie, au Nigeria et en Inde. La Libye et l'Egypte sont supposées infectées ainsi que la plupart des pays du Moyen Orient (Pettersson *et al.*, 1998 ; Thiaucourt et Bölske, 1996).



© CIRAD-EMVT, 1999

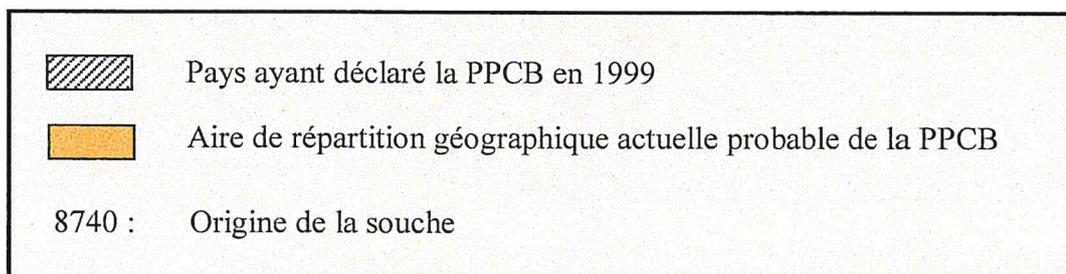


Figure 1 : Répartition géographique probable de la PPCB en Afrique, pays ayant déclaré la maladie en 1999 et origine des souches de *MmmSC* étudiées
(Masiga *et al.*, 1996 ; O.I.E., 1999)

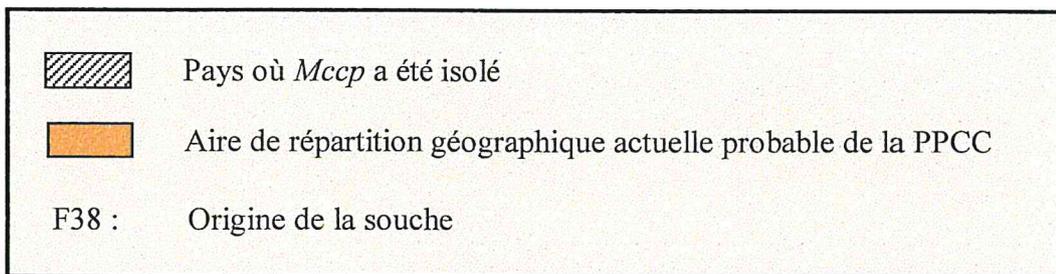
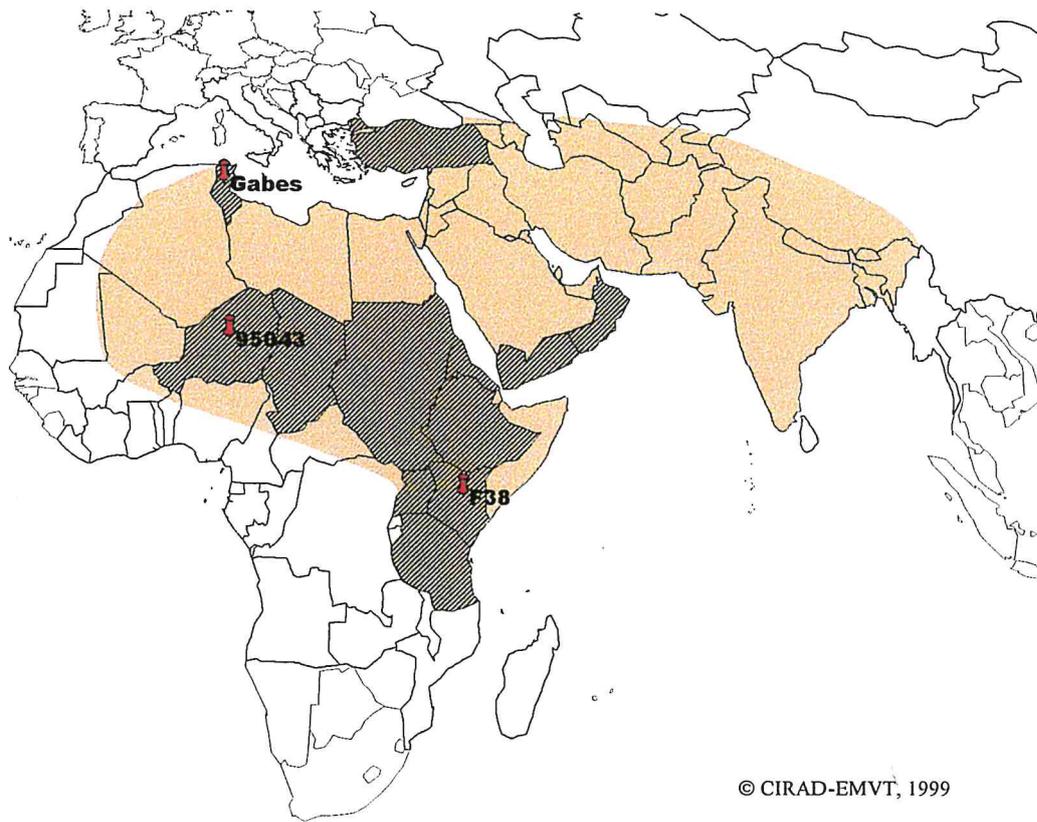


Figure 2 : Répartition actuelle probable de la PPCC, pays où *Mccp* a été isolé et origine des souches de *Mccp* étudiées
(O.I.E., 1999 ; Thiaucourt et Bölske, 1996)

3-2. Transmission

La PPCB et la PPCC se transmettent par contact étroit entre un animal malade et un animal sain. La contamination a lieu par voie aérogène. La transmission indirecte ne semble pas jouer un rôle important pour les deux maladies. En effet, les mycoplasmes sont fragiles et résistent très peu de temps dans le milieu extérieur. La PPCB et la PPCC apparaissent dans un troupeau après l'introduction d'un animal malade ou en phase d'incubation. L'existence de porteurs chroniques faciliterait la dissémination de la PPCC et de la PPCB (Provost *et al.*, 1987).

4. Isolement de l'agent étiologique

L'identification de l'agent correspondant est nécessaire pour confirmer le diagnostic de la PPCB ou de la PPCC. Or les mycoplasmes, et particulièrement l'agent de la PPCC, croissent très difficilement *in vitro* (tableau I). Leur croissance nécessite des milieux de culture très complexes. En effet, les mycoplasmes sont les plus petits organismes connus à réplification autonome. Leur génome est de très petite taille et comprend le minimum essentiel à leur survie dans l'hôte. Certains gènes impliqués dans le métabolisme leur font défaut par rapport aux autres bactéries. Ils sont dépourvus de paroi. Il semble que leur adaptation à un mode de vie parasitaire essentiel soit à l'origine de ces particularités (Razin, 1997). Ainsi, on comprend pourquoi les agents de la PPCB et de la PPCC ont été isolés très tardivement. En effet, alors que la première description clinique de la PPCB était effectuée en 1769 (Delafond, 1844), l'isolement de l'agent étiologique n'eut lieu qu'en 1898 (Nocard et Roux, 1898). De même plus d'un siècle sépare la première description clinique de la PPCC en Algérie en 1873 (Thomas, 1873) et l'isolement de l'agent en 1976 (Macowan et Minette, 1976).

5. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (MmmSC) et *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), deux mycoplasmes membres du "groupe Mycoides"

Le "groupe Mycoides" comprend plusieurs mycoplasmes : *MmmSC* et *Mccp* sont les deux seuls du groupe à l'origine de maladies contagieuses majeures. Les autres membres, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype LC, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* et *Mycoplasma sp.* groupe 7 (Cottew *et al.*, 1987), participent à un complexe pathologique appelé syndrome de "MAKePS", pour mammites, agalaxie, kératites, pneumonies et septicémie (tableau I). Chez les petits ruminants, ces mycoplasmes sont donc aussi capables d'induire une pleuropneumonie, mais elle reste souvent limitée aux jeunes animaux. Chez les femelles allaitantes, la mammité est le symptôme majeur observé (Thiaucourt *et al.*, 1996). Les six espèces ou sous-espèces du "groupe Mycoides" ont de nombreux caractères génotypiques, phénotypiques et antigéniques en commun. Cette grande homogénéité entre les membres de ce groupe de mycoplasmes a causé pendant longtemps des problèmes d'identification et de taxinomie. Actuellement, les techniques de biologie moléculaire permettent une meilleure identification, taxinomie et phylogénie de ces espèces ou sous-espèces.

Tableau I : Espèces de mycoplasmes pouvant être rencontrées chez les caprins
(Damassa *et al.*, 1992 ; Mattsson et Johansson, 1993 ; Weisburg *et al.*, 1991)

ESPECES	POSITION TAXONOMIQUE	POSITION TAXONOMIQUE (ARN 16S)	HÔTES HABITUELS	POUVOIR PATHOGENE	FACILITE DE CULTURE IN VITRO
<i>M. capricolium</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	"groupe mycoïdes"	groupe Spiroplasma	caprins	P.	très difficile
<i>M. capricolium</i> subsp. <i>capricolium</i>	"groupe mycoïdes"	groupe Spiroplasma	caprins, ovins	M.A.Ke.P.S	très facile
<i>M. sp.</i> Groupe 7 (Leach)	"groupe mycoïdes"	groupe Spiroplasma	bovins	M.A.	très facile
<i>M. mycoïdes</i> subsp. <i>mycoïdes</i> LC	"groupe mycoïdes"	groupe Spiroplasma	caprins, ovins	M.A.Ke.P.S	très facile
<i>M. mycoïdes</i> subsp. <i>capri</i>	"groupe mycoïdes"	groupe Spiroplasma	caprins, ovins	M.A.Ke.P.S	très facile
<i>M. putrefaciens</i>	assez voisin du "groupe mycoïdes"	groupe Spiroplasma	caprins, ovins	M.A.Ke.P.S	très facile
<i>M. agalactiae</i>	voisin de <i>M. bovis</i>	groupe Hominis	caprins, ovins	M.A.Ke.P.S	très facile
<i>M. ovipneumoniae</i>	nd	nd	caprins, ovins	Douteux	facile
<i>M. arginini</i>	nd	groupe Hominis	caprins, ovins	Néant	difficile
<i>M. conjunctivae</i>	nd	nd	caprins, ovins	C.	facile
<i>M. auris</i>	nd	nd	caprins	nd	facile
<i>M. cottlewi</i>	nd	nd	caprins	nd	facile
<i>M. yeatsii</i>	nd	nd	caprins	nd	facile

M. : mammite, A. : arthrite, Ke. : kératite, P. : pleuropneumonie, S. : septicémie, C. : conjonctivite

II. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA PPCB ET DE LA PPCC

1. Définition

Le terme d'épidémiologie moléculaire s'applique aux diverses techniques qui permettent de typer ou sous-typer des organismes pathogènes (Tibayrenc, 1998b).

2. Intérêts et applications de l'épidémiologie moléculaire

L'épidémiologie moléculaire, en étudiant la variabilité du génome des agents pathogènes, contribue à améliorer les méthodes de diagnostic et de prophylaxie des maladies occasionnées par ces agents pathogènes. En effet, l'analyse des différences entre les souches pathogènes et vaccinales, par exemple, peut permettre de déceler des gènes impliqués dans la virulence. On peut ainsi envisager de produire des nouveaux vaccins par une délétion ciblée de ces gènes ou de certaines portions génomiques responsables de la virulence. La différenciation entre espèces, sous-espèces ou souches d'agents pathogènes permet d'affiner les méthodes de diagnostic par une identification précise du germe en cause.

Appliquées dans les pays "en développement", des techniques simples et rapides d'identification des souches sont indispensables pour la PPCC et la PPCB. Le besoin de moyens de diagnostic et de lutte plus performants se fait particulièrement ressentir pour la PPCB, aujourd'hui en forte recrudescence en Afrique et responsable de pertes importantes parmi le bétail.

➤ Pour contrôler l'identité des souches lors de la **production de vaccins** par les différents laboratoires compétents. Depuis le début du projet PARC, le PANVAC est officiellement responsable de ce contrôle pour la PPCB (Masiga et Domenech, 1995). Or ce n'est que très récemment que l'identification spécifique de la souche vaccinale T1 par PCR a été possible (Lorenzon *et al.*, soumis pour publication). Cette souche est actuellement utilisée dans toute l'Afrique depuis les recommandations du PANVAC en 1990 (1990). Le contrôle de l'identité de la souche vaccinale utilisée dans les campagnes de vaccination contre la PPCB en Afrique est essentiel pour l'interprétation des échecs éventuels. La campagne de vaccination menée au Botswana en 1996 suite à la réintroduction de la PPCB dans le pays, par exemple, ne permit pas le contrôle de la maladie. La FAO avait alors émis des doutes sur l'identité de la souche vaccinale utilisée. Il a été confirmé aujourd'hui, par la réaction de PCR spécifique récemment mise au point, que la souche utilisée alors était bien la souche T1. Ces résultats récents reposent donc le problème du degré de protection conféré par les souches T1 (T1/44 ou TISR) et des conditions de leur utilisation.

➤ Pour identifier l'**origine d'un foyer**. En effet, l'identification de la souche circulant dans un foyer permettrait de détecter la source de l'infection avec certitude. Aucune technique facilement utilisable dans un laboratoire de diagnostic n'est disponible actuellement pour différencier les souches pathogènes de *MmmSC* ou de *Mccp*.

➤ Pour mieux comprendre certains aspects encore obscurs concernant la **prophylaxie** ou l'**épidémiologie** :

- L'origine des **réactions post vaccinales** observées lors de la vaccination contre la PPCB avec la souche T1/44 est encore inconnue. Ces réactions apparaissent soit 24 à 48 heures, soit 20 jours après l'injection et se manifestent sous la forme d'une atteinte générale ou d'un œdème plus ou moins envahissant sur le site d'injection. Ces réactions peuvent occasionner la mort de l'animal et sont en partie responsables des réticences des éleveurs à pratiquer la vaccination. Or il n'est pas possible actuellement de déterminer si elles sont dues à la souche vaccinale elle-même ou si elles correspondent à un réveil d'une forme latente de la maladie. L'identification de la souche responsable des lésions permettrait de déterminer s'il s'agit de la souche vaccinale ou non.
- Le rôle des **porteurs chroniques** dans la dissémination de la PPCB ou de la PPCC est mal défini. Si une même souche est identifiée à un même endroit pendant une longue période, c'est qu'elle persiste chez les porteurs inapparents.
- L'épidémiologie moléculaire est un outil aussi utilisé pour retracer l'**historique** de nombreuses maladies. Malgré la mise en évidence du polymorphisme des souches de *MmmSC* par différentes techniques, d'autres études sont nécessaires pour comprendre l'évolution de la PPCB au cours du temps à l'échelle des continents. **En Afrique**, ces études devraient par exemple confirmer les origines distinctes du foyer de PPCB centré sur l'Angola, *a priori* importé d'Europe via l'Afrique du Sud, et du foyer de la corne de l'Afrique, dont l'origine, vraisemblablement plus ancienne, est inconnue. **En Europe**, l'origine des souches qui circulent aujourd'hui dans le vieux continent est toujours inconnue car ces souches sont différentes des souches africaines actuelles.

3. Les techniques appliquées à l'épidémiologie moléculaire de la PPCB et de la PPCC

3-1. Introduction

L'essor de la biologie moléculaire permet de distinguer plusieurs souches d'une même espèce d'un pathogène. Cette différenciation s'appuie sur le polymorphisme génétique au sein de l'espèce étudiée. Ce polymorphisme est mis en évidence par des techniques phénotypiques ou génotypiques.

3-2. Techniques phénotypiques

3-2-1. Caractères morphologiques et biochimiques

Les techniques "classiques" de microbiologie n'offrent que des possibilités limitées de typage ou sous-typage. L'analyse des caractères morphologiques ou biochimiques des mycoplasmes nécessite leur isolement, ce qui est long et fastidieux, surtout pour *Mccp*, qui croît très difficilement *in vitro* (tableau I). L'aspect mammiliforme ou d'œuf sur le plat des colonies de *MmmSC* en milieu solide ou la présence de comètes en milieu liquide sont par exemple des caractéristiques morphologiques de *MmmSC*. En plus de certaines particularités d'espèce ou sous-espèce, des différences peuvent être observées entre différentes souches mais elles sont

peu prononcées et souvent inconstantes. Les critères morphologiques ou biochimiques ne sont donc pas intéressants pour la différenciation des souches.

3-2-2. Tests immunologiques

Certains tests, comme l'inhibition de croissance utilisée couramment en virologie, permettent l'identification d'une espèce de mycoplasme par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques. L'inhibition de croissance permet de différencier certaines souches d'une même espèce de mycoplasme. Toutefois, cette technique n'est pas assez simple et fiable. De plus, elle est très difficile à standardiser d'un laboratoire à l'autre.

3-2-3. Les profils protéiques

L'étude des profils protéiques de différentes souches peut s'effectuer par électrophorèse en gel de polyacrylamide, SDS-PAGE (Leach *et al.*, 1989) et éventuellement par Western Blotting, c'est-à-dire par transfert des protéines migrées en gel sur membrane, suivi d'une réaction avec différents types de sérums. Ces techniques sont assez fines et ont révélé une diversité assez grande parmi des souches de *Mcc*, *Mmc* et *MmmLC* alors que les souches de *MmmSC* et *Mccp* semblent très homogènes (Costas *et al.*, 1987 ; Poumarat et Solsona, 1995 ; Thiaucourt, 1994 ; Thiaucourt *et al.*, 1998). Toutefois, les Western Blot sont difficiles à standardiser et les résultats obtenus par SDS-PAGE peuvent être biaisés par la présence ou l'absence de protéines hypervariables.

En effet, plusieurs mécanismes d'hypervariabilité des lipoprotéines membranaires ont été mis en évidence chez certains mycoplasmes (Citti et Rosengarten, 1997). Ces lipoprotéines exprimées à la surface de certains mycoplasmes possèdent des propriétés antigéniques et sont capables de varier entre différents clones d'une même population (figure 3). Cette variabilité interviendrait dans l'échappement des mycoplasmes à la réponse immune de l'hôte.

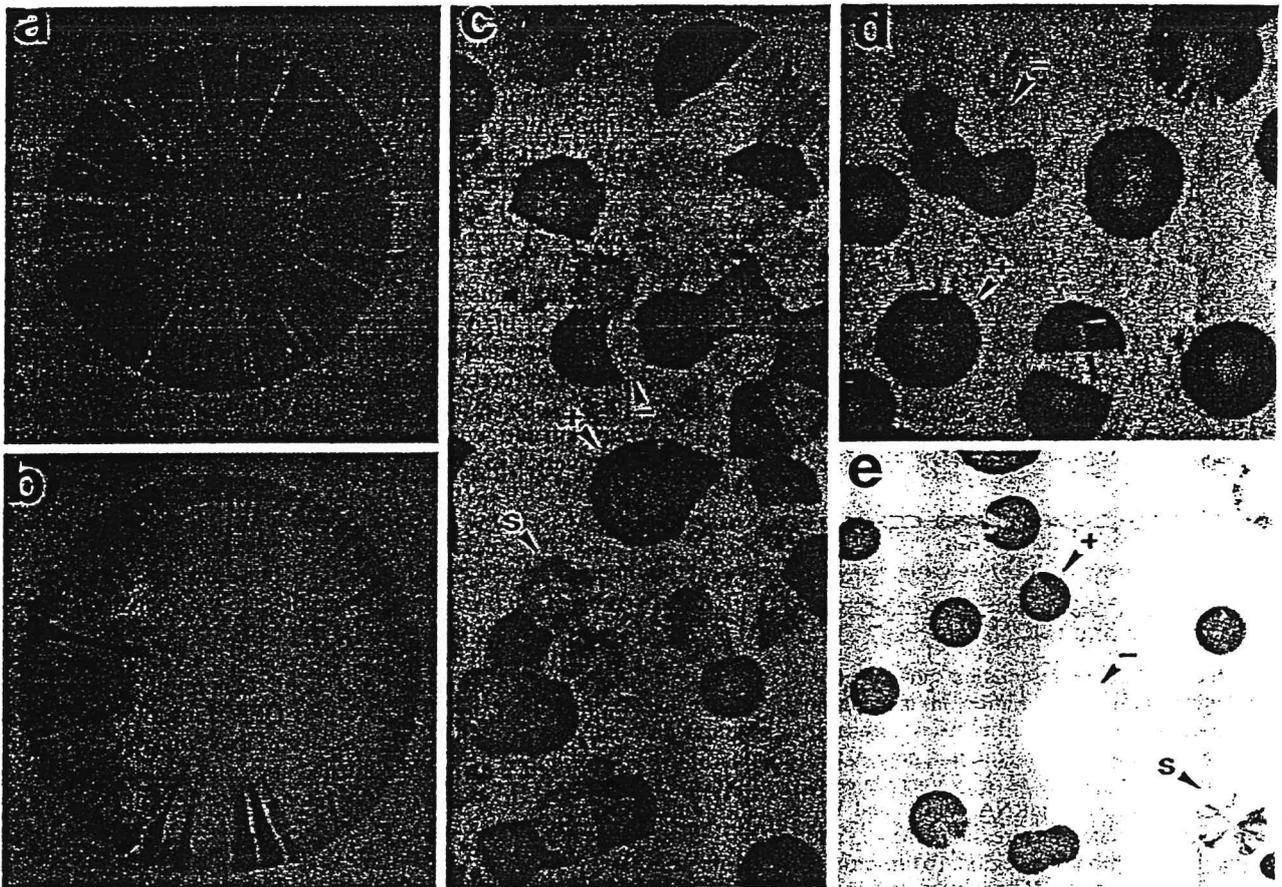


Figure 3 : Variation dans l'expression des antigènes de surface de populations clonales de mycoplasmes révélée par des colorations immuno-chimiques avec différents anticorps monoclonaux spécifiques.

Coloration immuno-chimique positive (a) et négative (b) de colonies de *Mycoplasma hyorhinis*, montrant différentes portions correspondant à des phénotypes différents. Profils immuno-chimiques hétérogènes observés au sein de populations dérivées d'une colonie de *Mycoplasma hyorhinis* (c), *Mycoplasma gallisepticum* (d) ou *Mycoplasma bovis* (e). Les colonies à phénotype positif (+), négatif (-) ou mixte (S) sont indiquées par des flèches.

(Citti et Rosengarten, 1997)

3-2-4. Les anticorps monoclonaux (Mabs)

Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour le **diagnostic** de la PPCB. Dans le cas de l'ELISA de compétition, l'anticorps monoclonal reconnaît un épitope présent uniquement sur les souches de *MmmSC* et permet ainsi une identification de l'agent de la PPCB avec une grande spécificité (Le Goff et Thiaucourt, 1998). Pour la **différenciation des souches**, l'utilisation des anticorps monoclonaux est délicate. En effet, la difficulté réside dans le choix d'un épitope adapté : Certains épitopes spécifiques d'un groupe de souches sont susceptibles de changer entre deux variants clonaux, s'ils se trouvent sur une région hypervariable (figure 3). Dans ce cas, les Mabs ne seraient plus capables de reconnaître cet épitope.

3-2-5. Conclusion

Les techniques phénotypiques sont limitées puisqu'elles n'analysent, par définition, que les parties exprimées du génome. La plupart des protéines des mycoplasmes ne sont codées que par un seul gène, comme dans le cas des protéines membranaires hypervariables, par exemple. Une seule mutation sur ce gène peut donc changer radicalement la nature de la protéine ou modifier son expression. Il est par conséquent difficile par une analyse des caractères phénotypiques d'en déduire la proximité, la phylogénie, de deux souches différenciées par ce type de méthode. De plus, les parties non codantes du génome sont plus enclines à varier que les gènes exprimés. Ces zones non codantes renferment donc un plus grand potentiel de marqueurs d'épidémiologie moléculaire dont le polymorphisme n'est détectable que par les techniques génotypiques. C'est pourquoi les techniques génotypiques sont actuellement de plus en plus utilisées pour étudier les différents groupes bactériens.

3-3. Techniques génotypiques

3-3-1. Restriction enzymatique de l'ADN total

◆ Principe

Cette technique s'effectue après isolement et récolte de l'ADN total de la souche. L'ADN est ensuite digéré en différents fragments par des enzymes de restriction. Le nombre et la longueur de ces fragments varient en fonction de la distribution des sites de coupure des enzymes de restriction sur le génome. Les produits sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique permet de classer les souches en groupes selon leur profil de restriction (figures 4 et 5).

◆ Avec les enzymes *Hind III* et *Pst I*, les deux souches vaccinales KH3J et T1 de *MmmSC* ont des profils très différents. La souche namibienne étudiée présente un profil à part. Ceci révèle la séparation du foyer d'Afrique australe du reste des foyers africains (figure 1). Pour les autres souches africaines, on observe une certaine corrélation entre les profils et l'origine géographique des souches (Thiaucourt *et al.*, 1998).

Avec les enzymes *Pst I* et *Bam HI* utilisées sur 27 souches de *MmmSC*, les souches européennes des récentes épizooties ont des profils de restriction différents des souches

africaines. Ceci montre que la PPCB qui sévit actuellement en Europe ne provient vraisemblablement pas d'une réintroduction à partir de l'Afrique (Poumarat et Solsona, 1995).

Une **digestion simultanée** avec les enzymes *Hind III* et *Xba I* a permis de classer 36 souches de *MmmSC* d'origines diverses (tableau II). La plupart des souches vaccinales ont pu être différenciées entre elles et des souches pathogènes par cette méthode. Par contre, il n'a pas été observé de corrélation stricte entre les profils et l'origine des souches (Nadew, 1999).

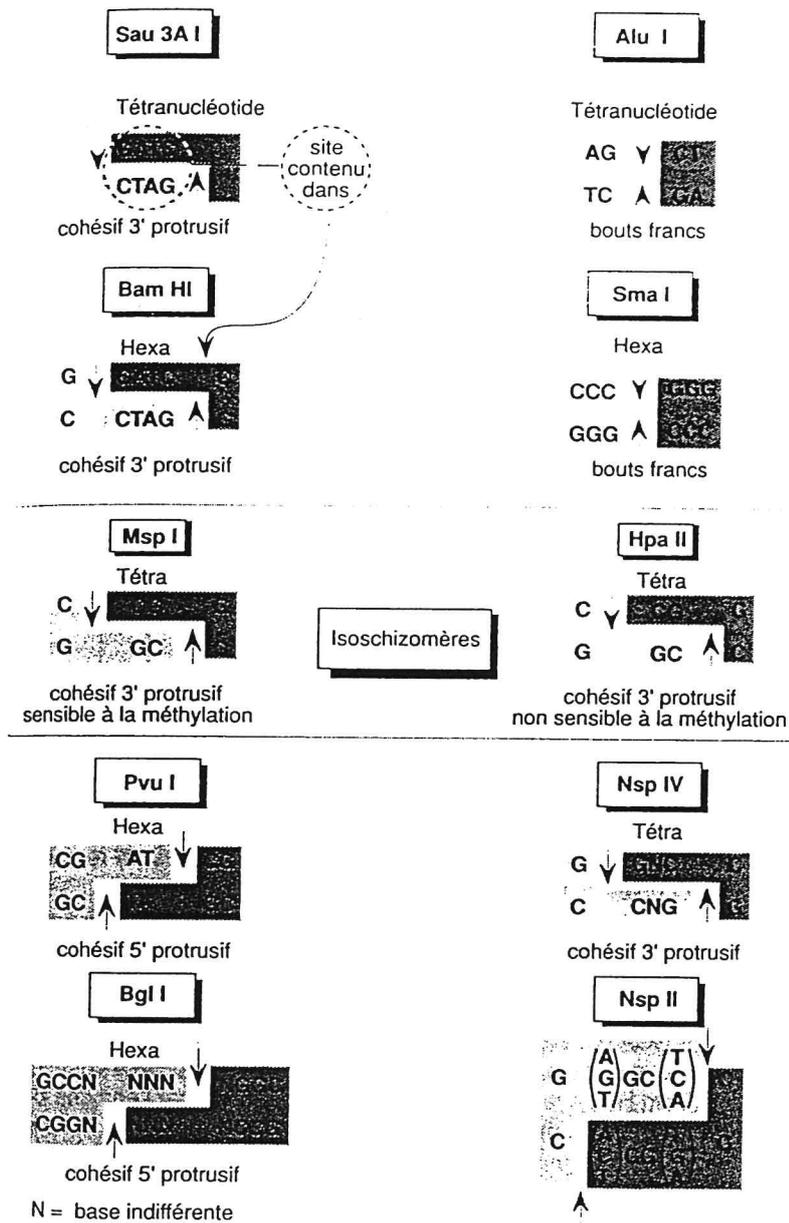


Figure 4 : Exemples de coupures et de sites de reconnaissance par des enzymes de restriction (Kaplan et Delpéch, 1993a)

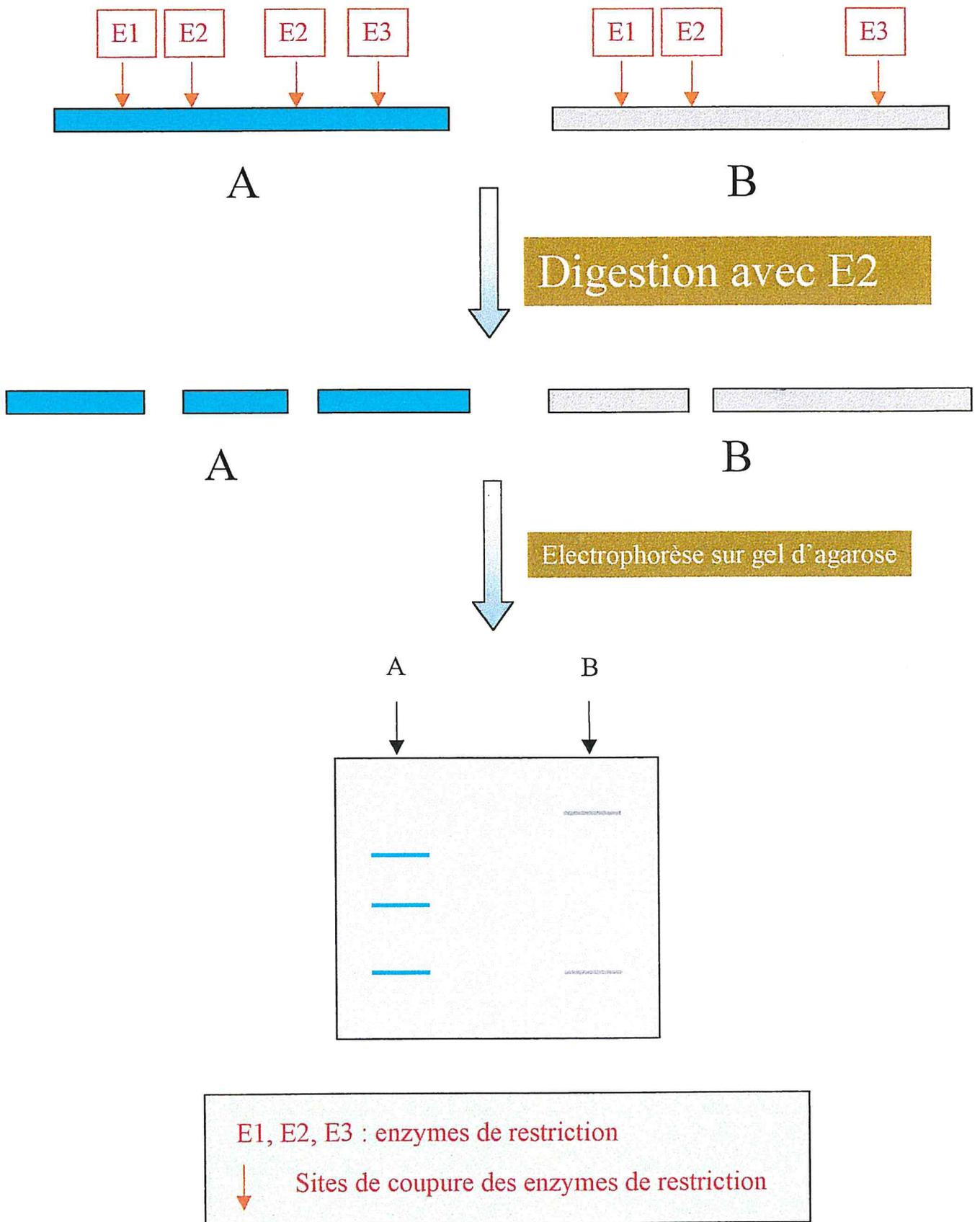


Figure 5 : Représentation schématique du principe de la différenciation par restriction enzymatique

Tableau II : Classification des souches de *MmmSC* selon des profils de restriction enzymatique obtenus après digestion simultanée par Hind III et Xba I
(Nadew, 1999)

Groupes	Souches	Origines	Nombre de bandes et poids moléculaire (kpb)
I	T ₁ /44 (v) T ₁ -SR (v) P.O P.O.2 9335-170 94158-c305 9373-804 PG1	Tanzanie Tanzanie France France Italie Portugal Guinée Inconnue	2 (14.5 et 22)
II	95014 Gamu-Goffa 94111 98029 8853 970025	Tanzanie Ethiopie Rwanda Bénin Cameroun Cameroun	2 (14.5 et 38)
III	Gladysdale V5 (v) Asmara (v) 970009 970038 9700039 970040 970041 970042 T ₂ -34 (v)	Australie Australie Inconnue Ethiopie Botswana Namibie Namibie Botswana Namibie Tanzanie	3 (10, 14.5 et 22)
IV	91130	RCA	3 (10.5, 14.5 et 22)
V	970043 C8988 87-137-10 9050-529-1 98050 960010 Fatick	Namibie Namibie Burkina Faso Côte d'Ivoire Guinée Mauritanie Sénégal	3 (11, 14.5 et 22)
VI	D-K32 (v)	Sénégal	3 (13, 14.5 et 22)
VII	KH ₃ J (v)	Soudan	4 (10, 12, 14.5 et 38)
VIII	9061-2059	Espagne	5 (9, 13, 14.5, 15 et 22)
IX	920055 (v)	Inconnue	1 (14.5)

(v) vaccinale.

3-3-2. Restriction enzymatique de l'ADN total couplée à une hybridation

◆ Principe

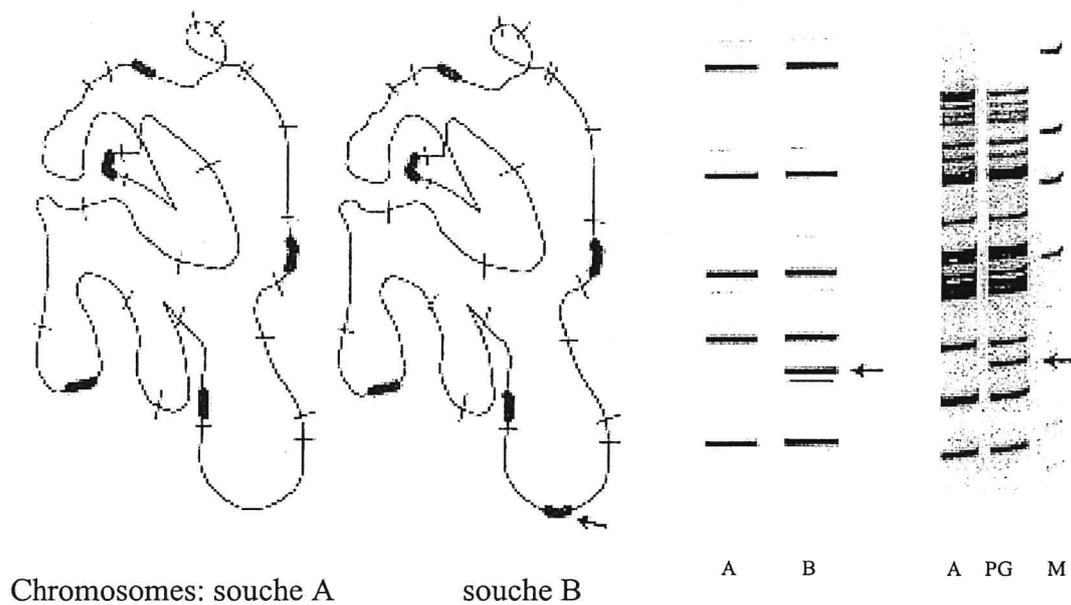
L'hybridation de l'acide nucléique repose sur la possibilité de 2 brins de s'associer entre eux pour former un duplex stable, dans des conditions favorables. L'association des paires de bases entre elles par des liaisons H est très spécifique. L'hybridation est détectée par le marquage d'un des deux ADN. L'ADN marqué est appelé sonde. La technique est appelée Southern Blot quand l'hybridation a lieu après transfert sur une membrane de fragments d'ADN digérés.

◆ La méthode de Southern Blot a été utilisée pour mettre en évidence les fragments contenant des séquences génomiques répétées. Ces **séquences d'insertion**, appelées IS pour "Insertion Sequence", sont spécifiques de certaines sous-espèces de mycoplasmes et semblent se trouver en nombre variable de copies selon les souches. Cette variabilité est due à la possibilité pour ces séquences de coder pour leur propre réplication.

➤ Les séquences d'insertion **IS 1296** se trouvent au nombre de 18-20 copies chez *MmmSC*, 5 chez *MmmLC* et 2 chez *Mycoplasma sp.* groupe 7 (Frey *et al.*, 1995). Le nombre variable de séquences d'insertion entre différentes souches de ces mycoplasmes permet leur sous-typage (figure 6). Les IS 1296 semblent intéressantes car leur transposition répliquative intervient à faible fréquence. Ceci leur procure une relative stabilité qui autorise une identification fiable des souches.

Des profils différents de distribution des séquences d'insertion IS 1296 ont été obtenus par l'analyse de 64 souches de *MmmSC* : Les souches européennes ont donné le même profil et semblent provenir d'une même lignée clonale. Les souches africaines et australiennes font partie d'un même groupe et présentent 4 types de profils différents. Les souches vaccinales T1, KH3J et V5 ont des profils à part. De plus, une souche de *MmmSC* isolée de poumons d'une chèvre et une autre isolée de lait d'une brebis à mammite ont montré des profils identiques aux autres souches européennes. Ceci repose la question du rôle éventuel de réservoir joué par les petits ruminants dans la persistance de la PPCB (Cheng *et al.*, 1995 ; Frey *et al.*, 1995 ; Frey et Nicolet, 1997).

➤ La présence de séquences d'insertions **IS 1634** est spécifique de *MmmSC*. Son génome en contient 30 copies. Ces séquences d'insertion présenteraient, selon leur emplacement, une certaine capacité de régulation de l'expression de certains gènes. Là encore, l'utilisation de la séquence d'insertion IS 1634 comme sonde lors de Southern Blot a permis de classer les souches européennes étudiées dans un même groupe (Vilei *et al.*, 1999)



À gauche : Les chromosomes de 2 souches proches, A et B, sont schématiquement représentés. Les barres représentent les sites de coupure de l'enzyme de restriction *Hind* III, la flèche montre la séquence d'insertion supplémentaire qui caractérise la souche B.

Au milieu : Southern blot : Représentation schématique de l'hybridation des fragments de restriction contenant l'IS 1296 avec une sonde marquée provenant de l'IS 1296. Les traits fins représentent les fragments issus de la digestion par *Hind* III. Les traits épais représentent les fragments d'ADN qui contiennent une séquence d'insertion.

À droite : Southern blot d'ADN génomiques de la souche Afadé (Af) et de la souche de référence (PG1) de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC digérés par *Hind* III et hybridés avec une sonde provenant de l'IS 1296

Figure 6 : Modèle de typage de *Mmm*SC par les séquences d'insertion
(Frey et Nicolet, 1997)

3-3-3. PCR

◆ Principe

L'amplification en chaîne par la polymérase est plus connue sous son acronyme anglais "Polymerase Chain Reaction" ou PCR. Cette technique de biologie moléculaire a été mise au point dans les années 80 (Saiki *et al.*, 1985). Elle permet, grâce à une enzyme thermostable, une polymérase, d'amplifier un double brin d'ADN en un grand nombre de copies. La réaction se fait en présence d'amorces pour la polymérisation. Ces amorces possèdent des séquences complémentaires de fragments choisis de l'ADN cible et se fixent sur celui-ci. L'amplification est réalisée par une succession de plusieurs cycles. Chaque cycle est composé de trois étapes : l'hybridation des amorces, l'élongation de l'ADN et la dissociation des brins associés. Seules la température et la durée changent d'une étape à l'autre. Ainsi, théoriquement, le nombre de copies obtenues du fragment d'ADN amplifié est de 2^n , n étant le nombre de cycles réalisés (figure 7).

La PCR est devenue en peu de temps un outil indispensable en biologie moléculaire. Elle constitue une étape de nombreuses techniques utilisées en épidémiologie moléculaire et son utilisation pour le diagnostic, depuis le début des années 90, est aujourd'hui routinière. Ainsi, selon le but recherché, les amorces peuvent être choisies de façon à obtenir une amplification spécifique pour un agent pathogène donné ou pour mettre en évidence un polymorphisme génétique.

◆ La technique de **PCR aléatoire** a déjà été utilisée pour le sous-typage des mycoplasmes. Cette technique utilise des amorces choisies aléatoirement. Un grand nombre d'amorces sont testées jusqu'à l'obtention d'une discrimination des souches.

➤ Ainsi, 25 souches de *Mycoplasma gallisepticum* ont été différenciées par **PCR aléatoire** à l'aide de 3 amorces choisies aléatoirement (Fan *et al.*, 1995).

➤ L'utilisation d'une **PCR semi-aléatoire** sur de nombreuses souches de *MmmSC* a donné une amplification différente pour la souche vaccinale T1 par rapport aux autres souches vaccinales et pathogènes (figure 8). La souche T1 est caractérisée par l'absence de l'amplification d'un fragment d'ADN de 1kb (Nadew, 1999). Dans un deuxième temps, Le séquençage de ce fragment a permis de définir des amorces qui amplifient la souche T1 de manière spécifique (Lorenzon, en attente de publication).

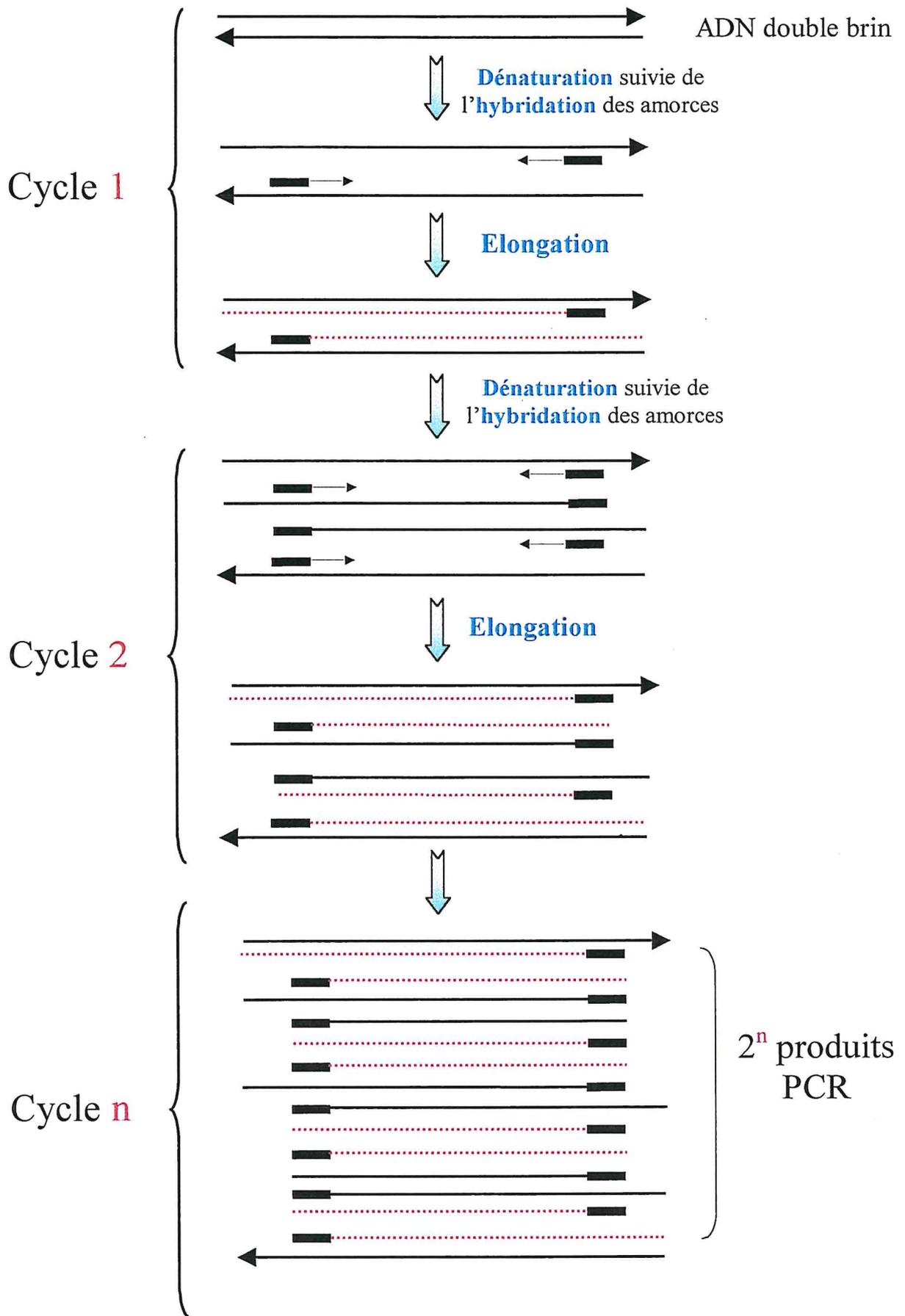


Figure 7 : Principe de l'amplification d'un ADN double brin par PCR

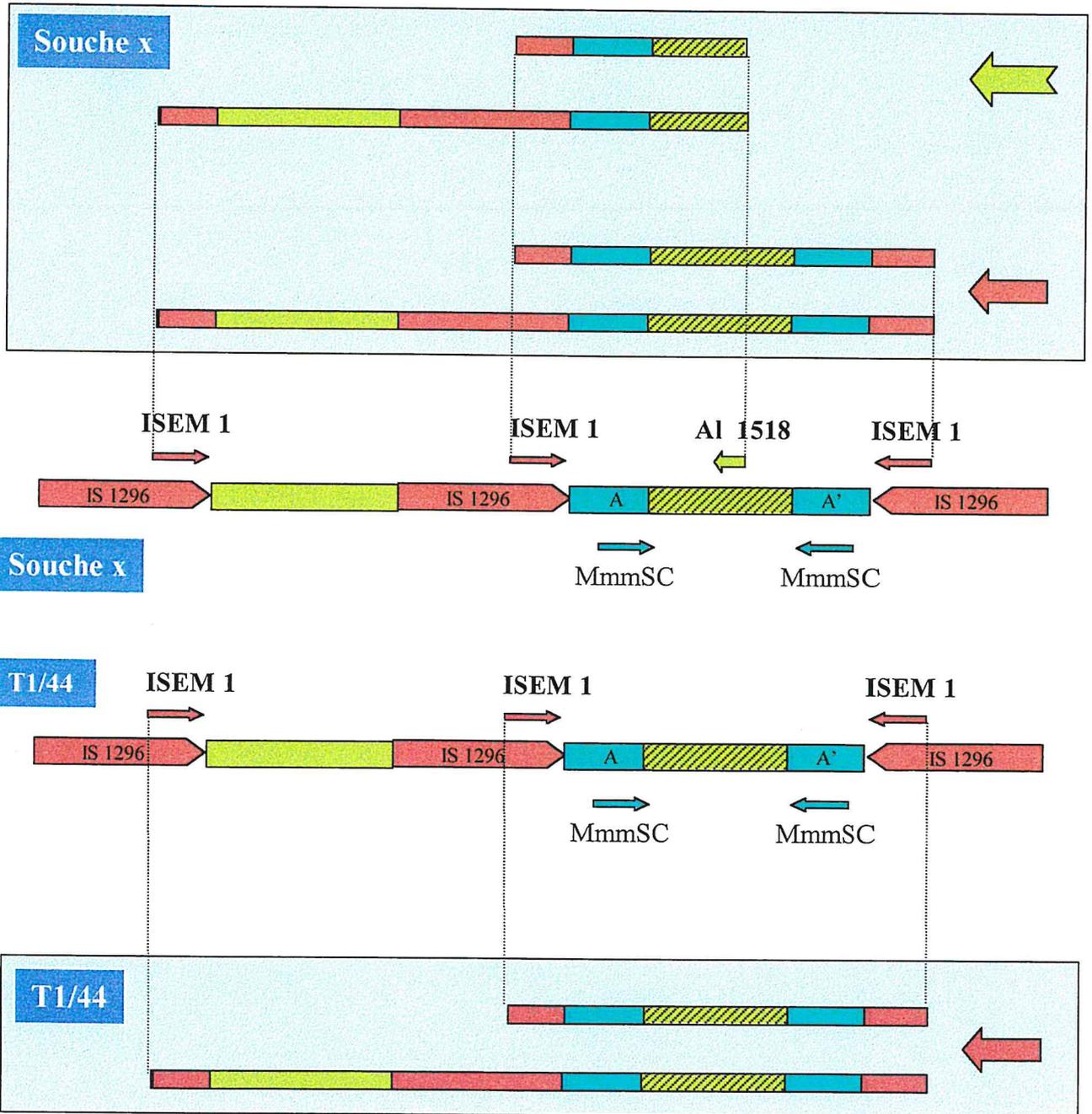


Figure 8 : Principe de la différenciation de T1/44 par PCR semi-aléatoire (Nadew, 1999)

3-3-4. Séquençage

◆ Principe

Les techniques actuelles de séquençage reposent sur une méthode enzymatique développée par Sanger en 1977 (Sanger *et al.*, 1977). L'ADN à séquencer est cloné dans un vecteur simple brin, un phage M13, par exemple. On utilise ensuite une amorce pour synthétiser un brin complémentaire de l'insert. Cette synthèse est réalisée par une polymérase en présence d'un désoxyribonucléotide (dNTP) radioactif, marqué au ^{35}S . L'ajout d'une très petite quantité d'un 2',3' di-désoxyribonucléotide (ddNTP) arrête la réaction de synthèse. En effet, ce nucléotide se caractérise par l'absence d'un atome d'oxygène en 3', ce qui empêche son estérification et par conséquent l'élongation de la molécule d'ADN (figure 9). L'incorporation de ce nucléotide se fait au hasard. On obtient ainsi autant de fragments avortés que de fois où la base correspondante est représentée. On sépare ensuite les fragments par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après autoradiographie, on obtient la séquence complémentaire de celle recherchée (figure 10).

Le séquençage automatique repose sur le même principe mais n'utilise pas de marquage radioactif. Les amorces sont marquées par 4 types de fluorochromes différents: un par type de base. Il est également possible de marquer les ddNTP directement. L'électrophorèse est réalisée en continu. La couleur de la bande est déterminée en bas du gel par un photomètre à laser. Le séquençage automatique peut se réaliser avec clonage ou par PCR. Dans le premier cas, on utilise des vecteurs de troisième génération permettant l'insertion d'ADN double brin. Dans le second cas, les fragments à séquencer sont obtenus par PCR. Les mêmes amorces peuvent ensuite être utilisées pour la réaction de séquence.

◆ Le séquençage de certaines portions génomiques est la méthode de choix pour différencier des souches entre elles. La difficulté réside dans le choix du gène à séquencer. En effet, il doit posséder des parties conservées pour la fixation des amorces d'amplification et des parties variables utiles à la discrimination des souches.

➤ Le gène qui code pour les ARN ribosomiaux de la sous-unité 16S est un marqueur moléculaire très utilisé en bactériologie. Ce gène est long d'environ 1500 pb et possède des régions conservées et des régions variables. L'étude de la variabilité des séquences de ce gène est à la base des études de phylogénie et de taxinomie bactériennes actuelles (Olsen et Woese, 1993 ; Woese, 1987).

Il a ainsi été démontré que les espèces de mycoplasmes *Mycoplasma mycoides* et *Mycoplasma capricolum*, membres du "groupe Mycoides", sont plus proches des espèces du genre *Spiroplasma* que des autres espèces du genre *Mycoplasma* (Weisburg *et al.*, 1989).

De même les sous-espèces *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Large Colony (*Mmm*LC) et *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) du "groupe Mycoides" présentent 99 % d'homologie de séquences. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC est donc apparemment plus éloigné de *Mmm*SC que de *Mmc*. Les espèces *Mycoplasma sp.* groupe 7 et *Mycoplasma capricolum* semblent également très proches, si bien que leur distinction pourrait être remise en question (Bascunana *et al.*, 1994 ; Pettersson *et al.*, 1996).

Onze polymorphismes du gène de l'ARN 16S ont été détectés entre plusieurs souches de *Mccp* et par rapport à un ancêtre commun hypothétique (Pettersson *et al.*, 1998). Ces souches ont été regroupées par homologie de séquences au sein d'un arbre phylogénétique et ont été classées en deux lignées principales (figure 11) :

- Les souches de lignée I provenant uniquement d'Afrique
- Les souches de lignée II présentes dans les pays situés sur les grandes routes maritimes.

Les membres du "groupe Mycoïdes" possèdent 2 opérons pour le gène de l'ARN 16S : *rrnA* et *rrnB*. Il existe entre ces deux opérons un certain polymorphisme, particulièrement important pour *Mccp*. Après analyse du polymorphisme de ces opérons chez plusieurs souches de *Mccp*, on constate qu'ils évoluent en parallèle. Pour chaque opéron, on observe le même profil phylogénétique des souches étudiées, ce qui permet de confirmer les analyses antérieures (figure 12). Ce polymorphisme est à l'origine d'une méthode d'identification spécifique de *Mccp* par PCR et digestion enzymatique : une portion de l'ARN 16S est amplifiée sur les 2 opérons *rrnA* et *rrnB* des membres du "groupe Mycoïdes". Or *Mccp* se différencie des autres membres par l'absence du site de coupure de l'enzyme de restriction *Pst* I sur l'opéron *rrnB*, ce qui permet son identification (Pettersson *et al.*, 1998).

L'ARN 16S est un bon marqueur épidémiologique pour certaines espèces ou sous-espèces, comme par exemple pour *Mccp*, où il présente un polymorphisme assez important. Par contre, il est insuffisant pour d'autres, comme par exemple pour *MmmSC*, où la variabilité est trop faible.

➤ Un gène susceptible de coder pour une protéine membranaire a été séquencé chez plusieurs souches du "groupe Mycoïdes". Des amorces choisies dans les régions conservées de ce gène et de séquences flanquantes amplifient deux fragments (Thiaucourt *et al.*, accepté pour publication, Vet. Microbiol.) :

- Un fragment de 298 pb qui correspond à une séquence intergénique entre le cadre de lecture ouvert ORF₂ et le gène *fba*, codant pour la fructose aldolase. Cette séquence intergénique a servi de base à une étude phylogénétique. Les 49 souches ont été séparées en un sous-groupe *mycoïdes* et un sous-groupe *capricolum*, permettant l'identification d'espèce. Le sous-groupe *capricolum* comprend deux lignées distinctes (figure 13). Ces résultats confirment ceux obtenus avec le séquençage du gène de l'ARN 16S.
- Un fragment de 1298 pb comprenant le cadre de lecture ouvert ORF₂. Ce fragment contient 7 polymorphismes parmi les souches de *Mccp*, autorisant leur discrimination. Par contre, aucun polymorphisme n'est visible pour *MmmSC*. L'agent de la PPCB s'est donc sans doute adapté à son hôte plus tard que l'agent de la PPCC.

➤ Le gène *lppA*, qui code pour une lipoprotéine nommée LppA, a été identifié chez *MmmSC* (Cheng *et al.*, 1996), *MmmLC*, *Mmc* (Monnerat *et al.*, 1999a) et *Msp.gr7* (Frey *et al.*, 1998).

Récemment, ce gène a été également identifié chez *Mcc* ainsi qu'un pseudo-gène homologue chez *Mccp* (Monnerat *et al.*, 1999b). En effet, l'homologue du gène *lppA* est appelé pseudo-gène chez *Mccp* parce qu'il n'est apparemment pas exprimé : malgré sa position et sa taille similaires aux gènes homologues des autres membres du "groupe Mycoïdes", il lui manque un cadre ouvert de lecture. Des variations de séquences ont été observées entre 3 différentes souches de *Mccp* pour ce pseudo-gène. Il est donc susceptible de servir de marqueur moléculaire pour les souches de *Mccp* (figure 14).

Chez *Mcc*, le produit d'expression du gène *lppA* correspond à une lipoprotéine spécifique. Ce gène permet l'identification spécifique de *Mcc* par PCR.

◆ Le séquençage est devenu incontournable, il représente le moyen d'analyse le plus détaillé. Cependant, il reste coûteux et long à effectuer, malgré les progrès réalisés. Il n'est pas encore possible d'envisager le séquençage systématique de grandes portions de génome sans un investissement considérable en temps et en moyens financiers. Il est donc important de développer des techniques génotypiques plus simples et moins coûteuses, en particulier pour les pays "en développement".

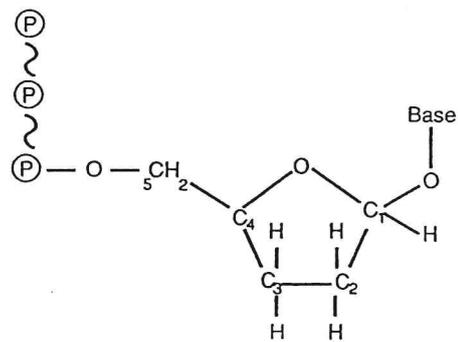


Figure 9 : Structure des di-déoxynucléotides utilisés dans la technique de Sanger
Le remplacement de l'hydroxyle en 3' par un hydrogène fait que ce nucléotide ne peut plus contracter de liaison phosphodiester, ce qui arrête la synthèse d'ADN

(Kaplan et Delpech, 1993b)

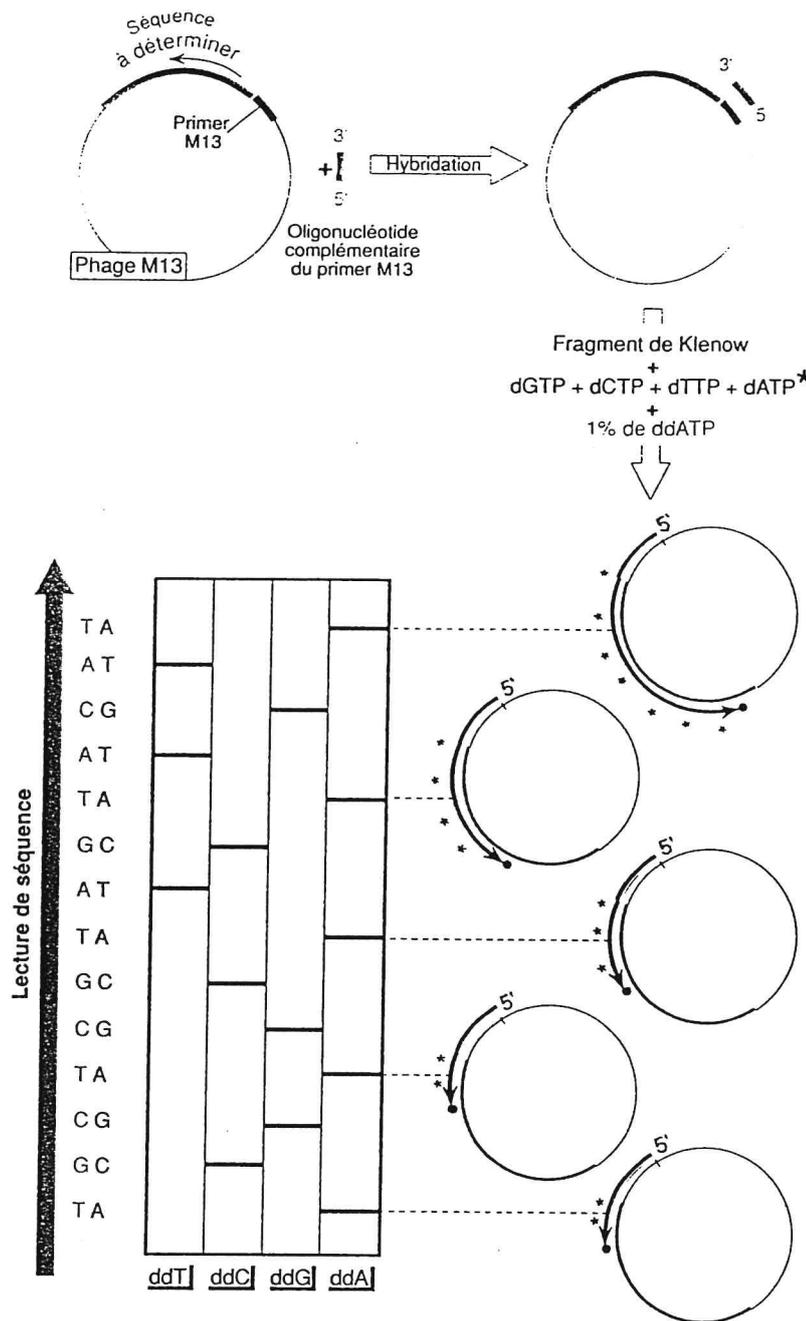


Figure 10 : Détermination de la séquence d'un acide nucléique par la méthode de Sanger (di-désoynucléotides)

Dans cet exemple, la séquence à déterminer est clonée dans un phage M13
(Kaplan et Delpech, 1993b)

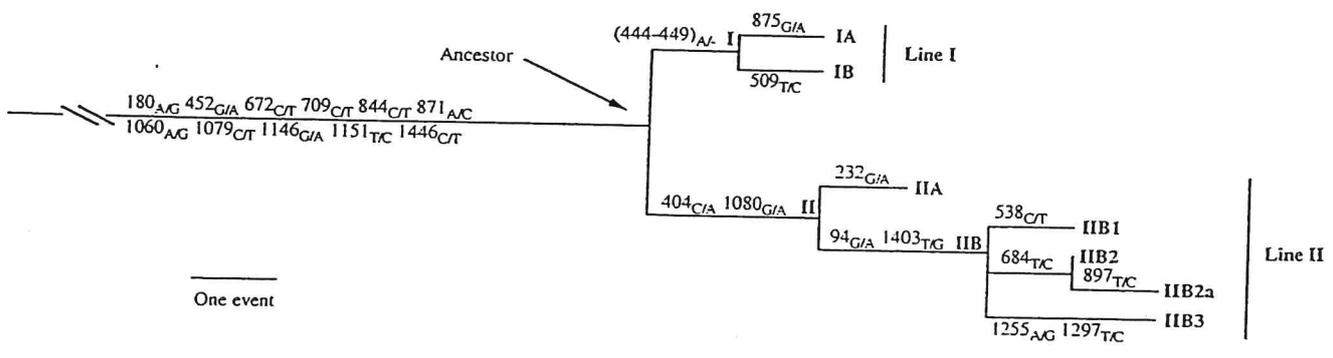


Figure 11 : Arbre phylogénétique basé sur des mutations sur le gène de l'ARN 16S de souches de *Mccp*

(Pettersson *et al.*, 1998)

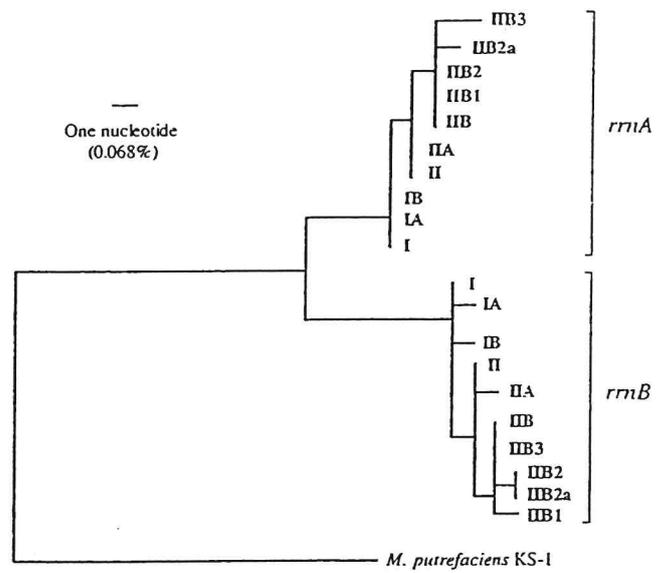


Figure 12 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ARN 16S des opérons *rrnA* et *rrnB*

(Petterson *et al.*, 1998)

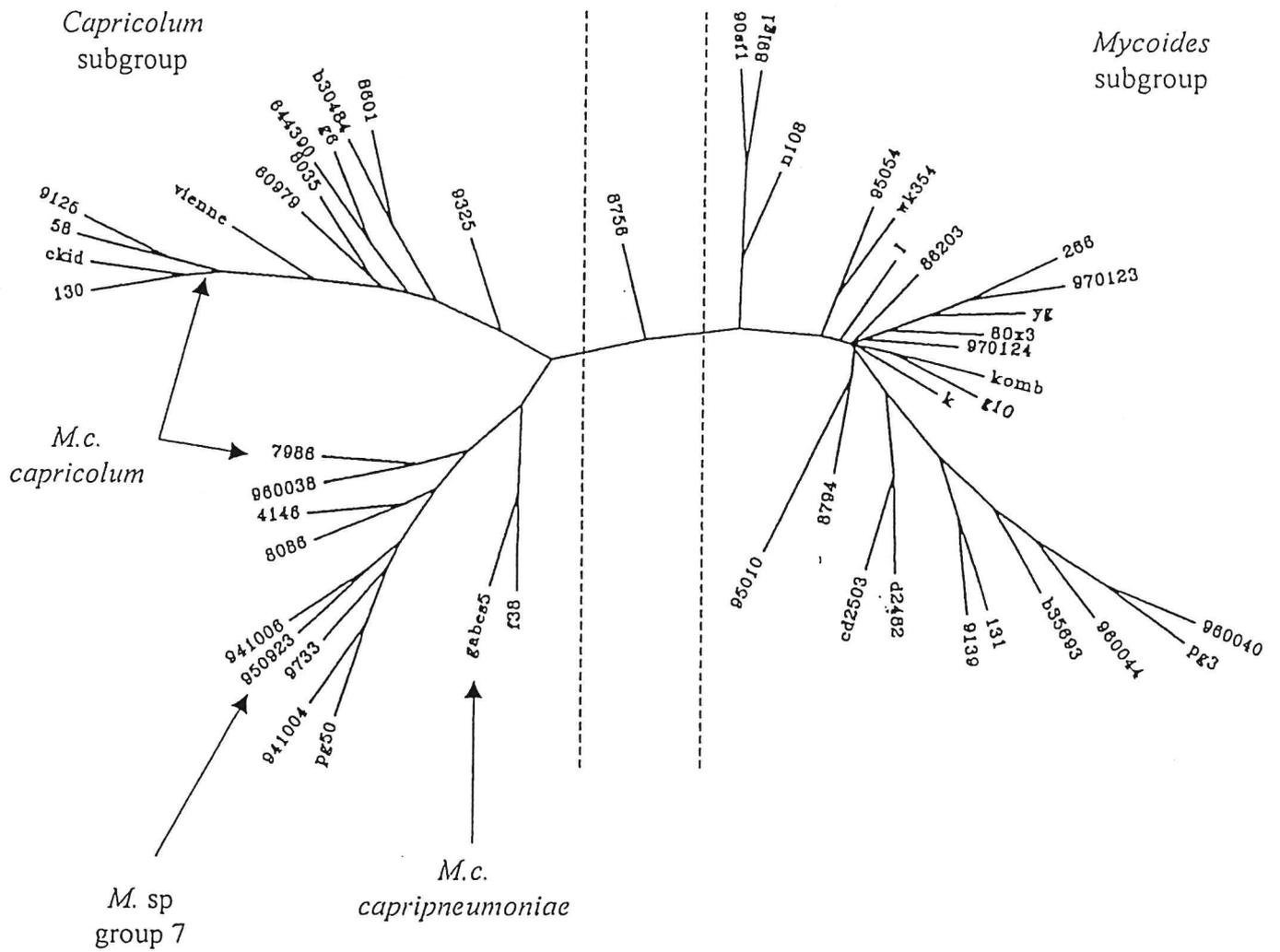


Figure 13 : Arbre phylogénétique de souches du "groupe Mycooides" basé sur une séquence intergénique de 320 pb entre l'ORF₂ et fba
 (Thiaucourt *et al.*, accepté pour publication, Vet. Microbiol.)

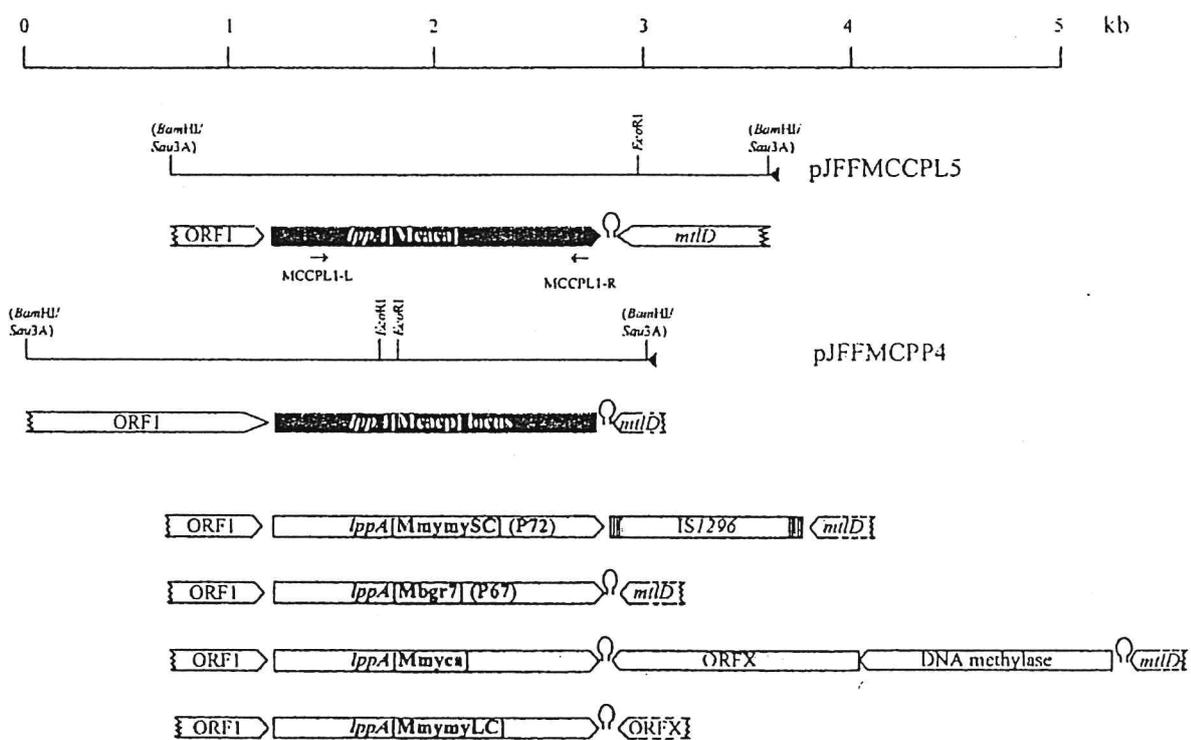


Figure 14 : Représentation schématique des loci du gène *lppA*.
 De haut en bas : gène *lppA* de *Mcc*, *Mccp*, *MmmSC*, *Msp.gr7*, *Mmc* et *MmmLC*. Le pseudo-gène homologue de *Mccp* est représenté sans flèche, puisqu'il n'est pas exprimé
 (Monnerat *et al.*, 1999b)

III. LA RESTRICTION ENZYMATIQUE (REA) DE PRODUITS DE PCR

1. Principe

Cette technique correspond à une PCR (II-3-3-3) suivie d'une restriction enzymatique des produits amplifiés, selon le même principe que la digestion de l'ADN total (II-3-3-1).

2. Intérêts

- La PCR ne nécessite pas nécessairement l'isolement préalable de l'agent pathogène. Elle permet d'obtenir un grand nombre de copies de la portion d'ADN amplifiée et fournit ainsi une quantité d'ADN suffisante pour la digestion enzymatique.
- La PCR et la digestion enzymatique sont simples et rapides à réaliser et nécessitent peu de moyens techniques et financiers. Ces deux techniques sont donc facilement applicables dans les laboratoires des pays en développement, y compris dans un laboratoire de diagnostic.
- Cette technique n'a pas encore été appliquée spécifiquement pour la recherche de marqueur d'épidémiologie moléculaire pour la PPCB et la PPCC.

3. Domaines d'application

En raison des avantages de cette technique, son utilisation est très fréquente dans de nombreuses disciplines. Elle sert principalement au diagnostic et à l'épidémiologie moléculaire.

3-1. Diagnostic

Le diagnostic d'une maladie passe par l'identification de l'agent étiologique. Cet agent est en général représenté par une espèce ou une sous-espèce. La PCR-REA est une méthode courante d'identification d'une espèce ou sous-espèce responsable d'une pathologie, comme le montrent les exemples suivants :

- L'identification des espèces de *Candida* communément impliquées dans des candidoses de patients atteints de leucémie. La sensibilité et la spécificité de la technique sont excellentes. Sa réalisation est beaucoup plus rapide que les techniques classiques de culture fongique (Morace *et al.*, 1999).
- La détection d'Adénovirus des volailles ("Fowl AdenoVirus", FAV) et de la poule pondeuse ("Egg Drop Syndrom virus", "EDS virus") s'effectue rapidement par une PCR-REA : la PCR est basée sur les parties génomiques codant pour certaines protéines de capsid. Les 12 souches de référence du FAV sont différenciables entre elles et du virus de l'EDS (Raue et Hess, 1998).
- L'identification des sous-espèces *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, responsables de la paratuberculose des ruminants, est

réalisée par une PCR sur les séquences d'insertion IS 1311, suivie d'une digestion par *Hinf*I et *Mse*I (Marsh *et al.*, 1999).

➤ L'identification de *Mmm*SC peut s'effectuer par une PCR commune aux membres du "groupe Mycoides" ou à l'espèce *Mycoplasma mycoides*, suivie d'une digestion par *Asn*I, produisant un nombre de fragments différent selon la sous-espèce (Bashiruddin *et al.*, 1994).

➤ L'identification de *Mccp* est possible par une PCR basée sur le gène de l'ARN 16S suivie d'une digestion par *Pst*I (Bascunana *et al.*, 1994).

➤ D'autres auteurs ont développé une méthode similaire d'identification de *Mmm*SC et de *Mccp*, basée sur la détection par PCR de parties du gène de l'ARN 16S communes au "groupe Mycoides" et sur la restriction enzymatique des fragments obtenus par *Pst*I et *Alu*I (Johansson *et al.*, 1997).

➤ *Mmm*LC, *Mcc* et *Msp.gr7* du "groupe Mycoides" et *Mycoplasma putrefaciens* sont également identifiables par PCR-REA avec les enzymes de restriction *Ase*I et *Ssp*I (Rodriguez *et al.*, 1997)

3-2. Epidémiologie moléculaire

➤ L'analyse de 100 souches de *Listeria monocytogenes* par PCR-REA a révélé 2 groupes distincts. Toutefois, aucune corrélation n'a pu être trouvée entre les profils de restriction et l'origine des souches (Unnerstad *et al.*, 1999).

➤ Les souches de référence de 30 sérovars correspondant à 7 espèces de *Leptospira* ont été classées en 7 groupes par PCR-REA. Cette méthode a confirmé la taxinomie réalisée par d'autres techniques. Son avantage réside dans la rapidité de sa réalisation (Brown et Levett, 1997).

Deuxième partie : Partie expérimentale

I. INTRODUCTION

Le choix des parties génomiques à analyser s'est effectué en fonction des résultats suivants :

- ◇ Le fragment génomique ciblé sur *MmmSC* a déjà montré un certain polymorphisme avec une technique de PCR semi-aléatoire pour certaines souches, dont la souche 87-137-10 (Nadew, 1999).
- ◇ Selon les auteurs des études réalisées sur le pseudo-gène *lppA*, cette portion génomique présente un polymorphisme entre certaines souches de *Mccp* (Frey, communication personnel ; Monnerat *et al.*, 1999a).

II. MATERIELS ET METHODES

1. Amplification en chaîne par la polymérase, "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

1-1. Souches étudiées

Les origines des souches étudiées, KH3J, 87-137-10 et 8740 pour *MmmSC* et F38, Gabes et 95043 pour *Mccp*, sont représentées dans les figures 1 et 2 respectivement.

◇ Les trois souches de *MmmSC* sont d'origines distinctes et ont déjà été différenciées par d'autres techniques (Cheng *et al.*, 1995 ; Nadew, 1999 ; Poumarat et Solsona, 1995 ; Thiaucourt *et al.*, 1998).

◇ De manière analogue pour *Mccp*, nous avons choisi 3 souches d'origines distinctes, présentant une certaine variabilité avec d'autres techniques (Pettersson *et al.*, 1998) ; (Thiaucourt *et al.*, Vet. Microbiol., accepté pour publication).

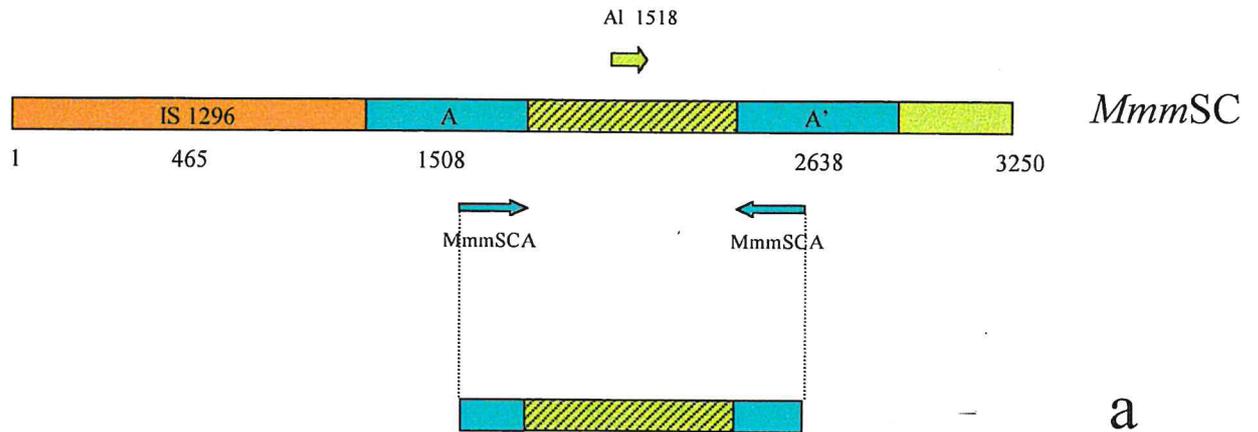
1-2. Conditions de culture

Les souches de *Mccp* sont issues de cultures dans un laboratoire de haute sécurité (P3) au Cirad-emvt (Annexe 1). Les souches de *Mccp* étudiées ont été utilisées sans extraction préalable.

Pour les souches de *MmmSC*, nous avons utilisé de l'ADN pur, extrait à partir de cultures, afin d'obtenir un meilleur rendement lors de l'amplification. Nous avons utilisé un kit d'extraction au phénol-chloroforme (Annexe 1).

1-4. Réactifs

- > dNTP (désoxyribonucléosides triphosphates) : Les dNTP utilisés correspondent à un mélange réactionnel relativement riche en dATP et dTTP, conformément au faible pourcentage de G et C du génome des mycoplasmes : dATP 30 mmol ; dTTP 30 mmol ; dGTP 15 mmol ; dCTP 15 mmol (Annexe 2).
- > Oligonucléotides utilisés comme amorces :
 - ◇ *MmmSCA* pour les souches de *MmmSC* (figure 15 ; Annexe 3).
 - ◇ *LppAF/LppAR* et *LppAF/MTLDR* pour les souches de *Mccp* (figure 16 ; Annexe 3).
- > Enzymes pour l'amplification : La Taq polymérase Qiagen, issue de la bactérie *Thermus aquaticus*, a été utilisée pour amplifier le fragment de 628 pb, fragment b (figure 16), de *Mccp*. L'Expand™ Long Template, qui permet l'amplification de fragments de poids moléculaires plus élevés, a servi pour le fragment de 1 682 pb, fragment c (figure 16), de *Mccp* et pour le fragment d'environ 2,2 kb, fragment a (figure 15), de *MmmSC* (Annexe 4).
- > Tampons : Les tampons utilisés ont été fournis avec les enzymes correspondantes : avec l'Expand™ Long Template : tampon 2, soit concentré à 10 X et contenant 22,5 mM de MgCl₂. Avec la Taq polymérase Qiagen : tampon concentré à 10 X contenant 15 mM de MgCl₂.



MmmSC : Portion du génome d'une souche de *MmmSC*

a : Fragment d'ADN amplifié par PCR avec l'amorce MmmSCA

A et A' : Fragments d'ADN conservés entre les différentes souches de *MmmSC*. A et A' ont des séquences identiques inverses

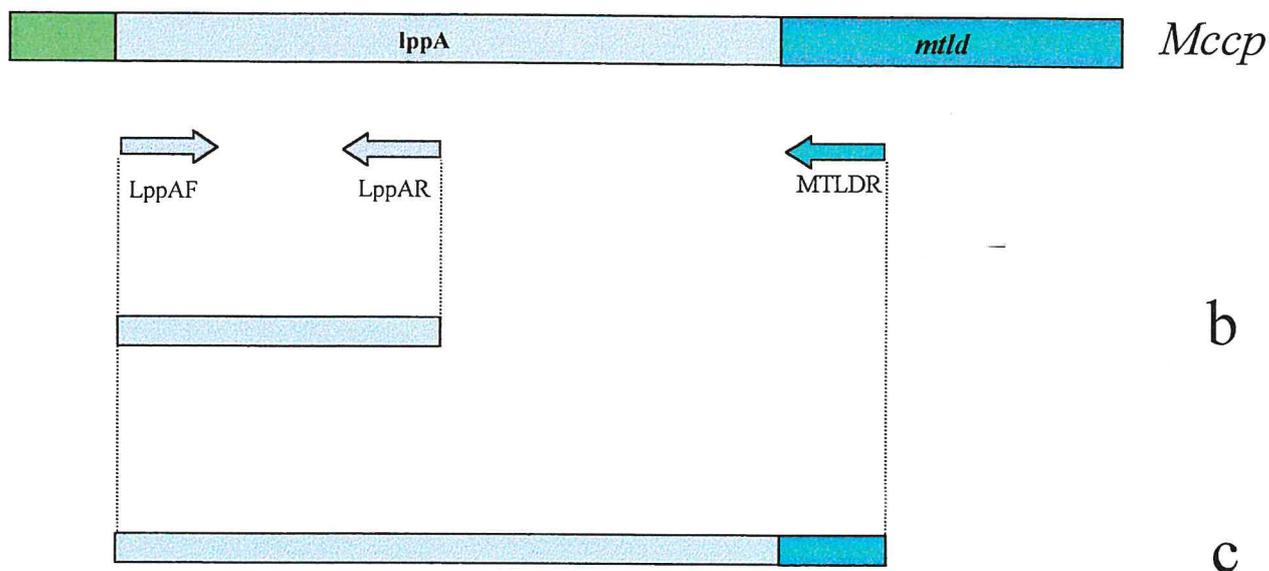
IS 1296 : Séquence d'insertion IS 1296

Al 1518 : Amorce aléatoire qui permet une différenciation entre T1/44 et les autres souches



Fragment d'ADN variable entre les différentes souches de *MmmSC*

Figure 15 : Principe de l'amplification par PCR d'un fragment d'ADN d'environ 2,2 kb supposé variable entre les souches de *MmmSC*



Mccp : Portion du génome d'une souche de *Mccp*

mtd : Gène impliqué dans le métabolisme et conservé entre les différentes souches de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*)

lppA : Gène codant pour la lipoprotéine A et supposé variable entre les différentes souches de *Mccp*

b : Fragment d'ADN de 628 paires de bases amplifié par le couple d'amorces LppAF et LppAR

c : Fragment d'ADN de 1 682 paires de bases amplifié par le couple d'amorces LppAF et MTLDR

Figure 16 : Principe de l'amplification par PCR de deux fragments d'ADN supposés variables entre les souches de *Mccp*

1-5. Préparation des mélanges réactionnels

➤ Avec la Taq polymérase Qiagen (tableau III)

Tableau III : Mélange réactionnel avec la Taq Polymérase Qiagen

Réactif	Quantité en μl
H ₂ O	37
dNTP	0,5
Tampon 10 X	5
Amorce 1	1
Amorce 2	1
Taq Qiagen	0,5
ADN	5

➤ Avec l'Expand™ Long Template (tableau IV)

Tableau IV : Mélange réactionnel avec l'Expand™ Long Template

Réactif	Quantité en μl
Mélange 1	
H ₂ O	20
dNTP	0,5
Amorce 1	1
Amorce 2	1
Mélange 2	
H ₂ O	16,75
Tampon 2	5
Expand™	0,75
ADN	5

1-6. Ajout de l'ADN

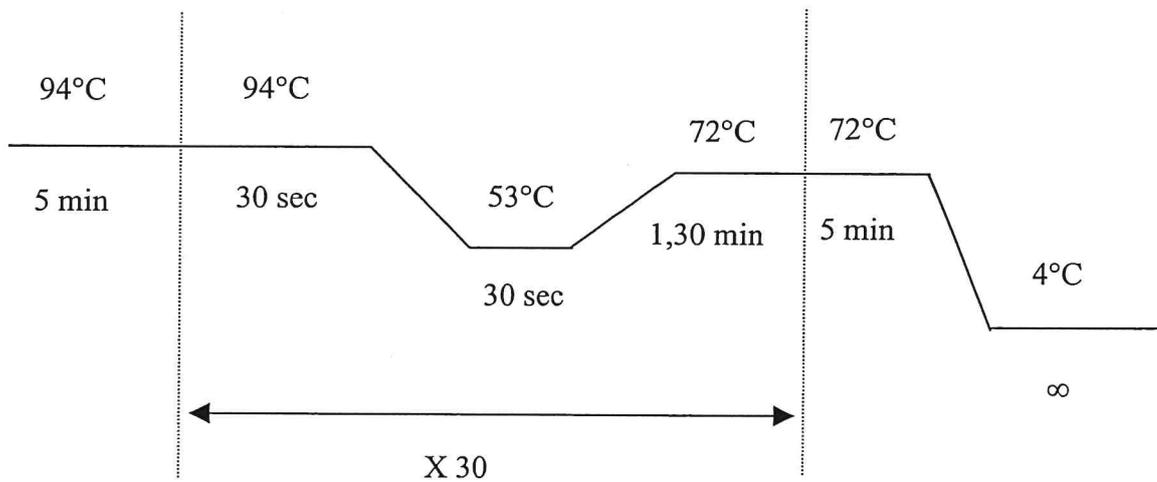
Pour éviter les contaminations, l'ADN a été ajouté dans une salle séparée de l'étape précédente (tableaux III et IV).

1-7. Amplification

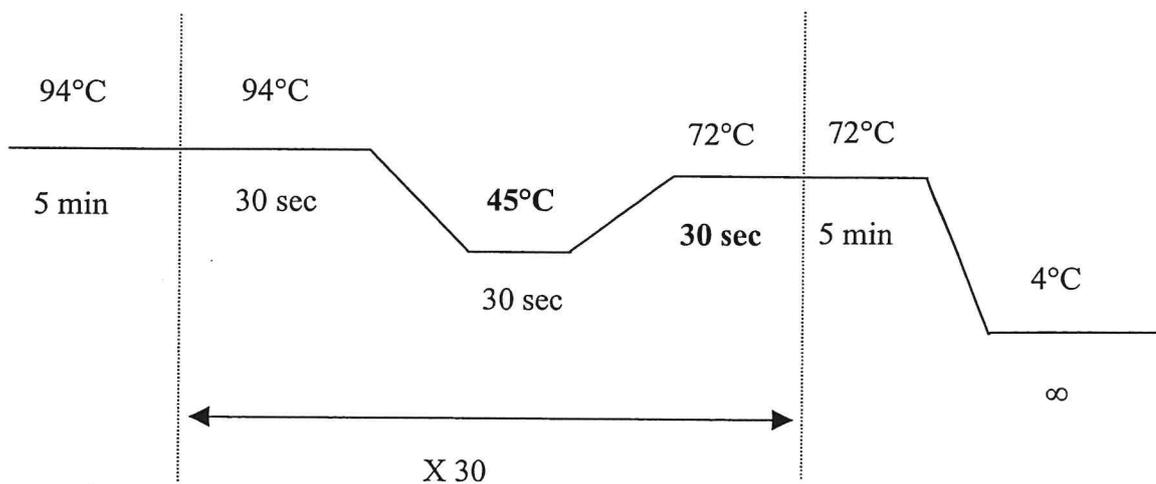
L'amplification a eu lieu dans un thermocycleur Perkin Elmer 2400. Le programme utilisé change en fonction de l'enzyme :

➤ Avec la Taq polymérase Qiagen

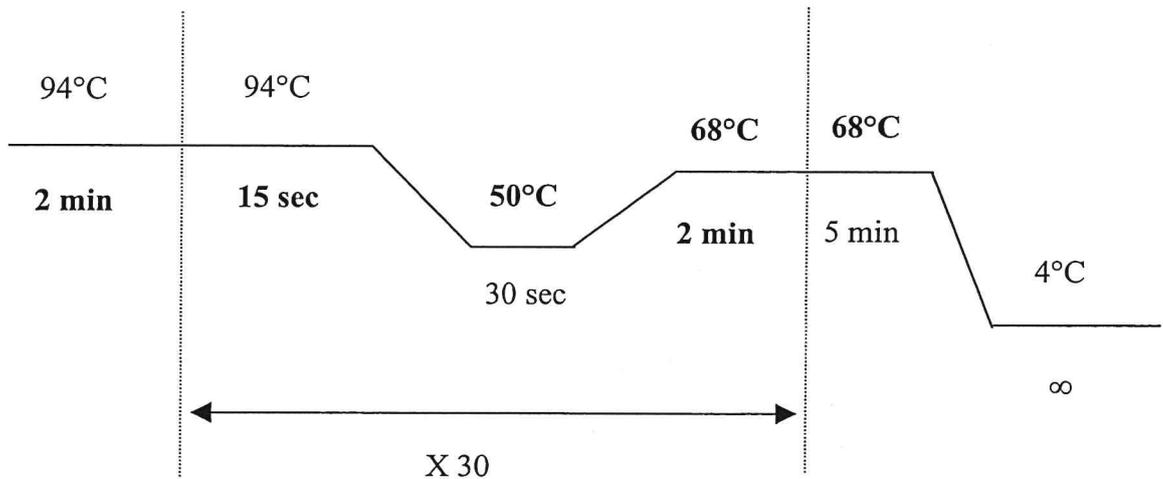
Programme I



Programme II



➤ Avec l'Expand™ Long Template



1-8. Révélation des produits de PCR par électrophorèse

➤ Préparation du gel : nous avons utilisé un gel d'agarose à 1 % au TAE (Annexe 6). Deux gouttes de Bromure d'Ethidium ajoutées au gel avant sa solidification permettent la coloration de l'ADN par fluorescence (Annexe 5).

➤ Migration : Après l'ajout de 2 µl de bleu de charge, 10 µl de produits amplifiés sont déposés sur le gel et migrés dans une cuve à électrolyse pendant 30 min sous un voltage de 140 Volts (Annexe 6).

➤ Photographie : Après migration, les fragments sont photographiés sous rayons ultraviolets avec un appareil Polaroid.

1-9. Ré-amplification

Les produits PCR obtenus ont servi de base à une nouvelle amplification, afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour réaliser la digestion. La ré-amplification s'est faite selon le même protocole que la première PCR. Seulement l'ADN issu de culture ou de culture suivie d'une extraction a été remplacé par 2 µl de produits amplifiés. Le risque de contamination est encore plus important lors d'une ré-amplification. C'est pourquoi il est indispensable d'inclure des témoins négatifs, où les 2 µl de produits amplifiés sont remplacé par de l'eau.

2. Analyse par restriction enzymatique, "Restriction Enzyme Analysis" (REA)

2-1. Estimation de la quantité d'ADN

La quantité d'ADN obtenue après ré-amplification a été évaluée en fonction de l'intensité du signal fluorescent sur le gel de migration (figure 19) : 2 µg et 1µg pour les fragments a et c respectivement.

2-2. Enzymes utilisées

La séquence du pseudo-gène *lppA* étant connue pour une souche de *Mccp*, il est possible de prédire la position des sites de coupures des différentes enzymes de restriction avec le logiciel PC-Gene. Le programme indique le nombre de fragments théoriquement obtenus avec chaque enzyme. Les enzymes doivent être choisies pour que le nombre des fragments obtenus ne soit ni trop faible, ni trop élevé. Un grand nombre de fragments de petite taille sera difficilement différenciable sur le gel d'électrophorèse. Trop peu de fragments explore un nombre trop restreint de nucléotides sur le génome, diminuant la chance d'observer une variabilité.

La liste des enzymes sélectionnées est donnée en Annexe 7

Si l'on ne possède pas d'information sur la séquence de la portion d'ADN étudiée, comme dans le cas du fragment a de *MmmSC*, le choix des enzymes s'effectue arbitrairement parmi celles qui possèdent des sites de coupure riches en bases A et T. Nous avons ici utilisé les mêmes enzymes pour le fragment a de *MmmSC* que pour les fragments b et c de *Mccp*.

2-3. Préparation des mélanges réactionnels

Tableau V : Mélanges réactionnels pour la digestion enzymatique

Réactif	Quantité en µl	
Tampon	3	
Enzyme	1,5	
H ₂ O	qsp 25	qsp 20
Produits PCR	5	10
	<i>MmmSC</i>	<i>Mccp</i>

2-4. Ajout des produits PCR

On a ajouté, selon l'estimation de la quantité d'ADN (II-2-1), 5 et 10 µl respectivement des produits PCR issus de la ré-amplification de *MmmSC* et *Mccp*.

2-5. Digestion enzymatique

La digestion enzymatique s'effectue à température constante dans un bain-marie. Les températures d'incubation varient en fonction de l'enzyme utilisée (Annexe 7). Afin d'obtenir une digestion complète, l'incubation s'est effectuée pendant la nuit.

2-6. Electrophorèse

- > Pour obtenir une meilleure discrimination des fragments obtenus par digestion, nous avons utilisé un gel d'agarose à 2 %. Une meilleure visualisation des fragments obtenus avec *Hinf*I a été obtenue avec un gel Métaphor à 2 %.
- > La migration s'est faite en général à 100 Volts pendant 3-4 heures. Une meilleure séparation a été obtenue par une migration à 35 Volts pendant la nuit.
- > Photographie : cf II-1-8.

3. Séquençage

- > Purification : les produits PCR obtenus par l'amplification du fragment b, fragment de 628 pb du génome de *Mccp*, ont été purifiés en vue du séquençage avec un kit de "USB corporation" (Annexe 8).
- > Les produits PCR purifiés ont été séquencés par la firme Genomexpress.

III. RESULTATS

1. PCR

- > Amplification avec la Taq polymérase Qiagen : figure 17
- > Amplification avec l'ExpandTM Long Template : figure 18

➤ Ré-amplification des produits obtenus précédemment : figure 19

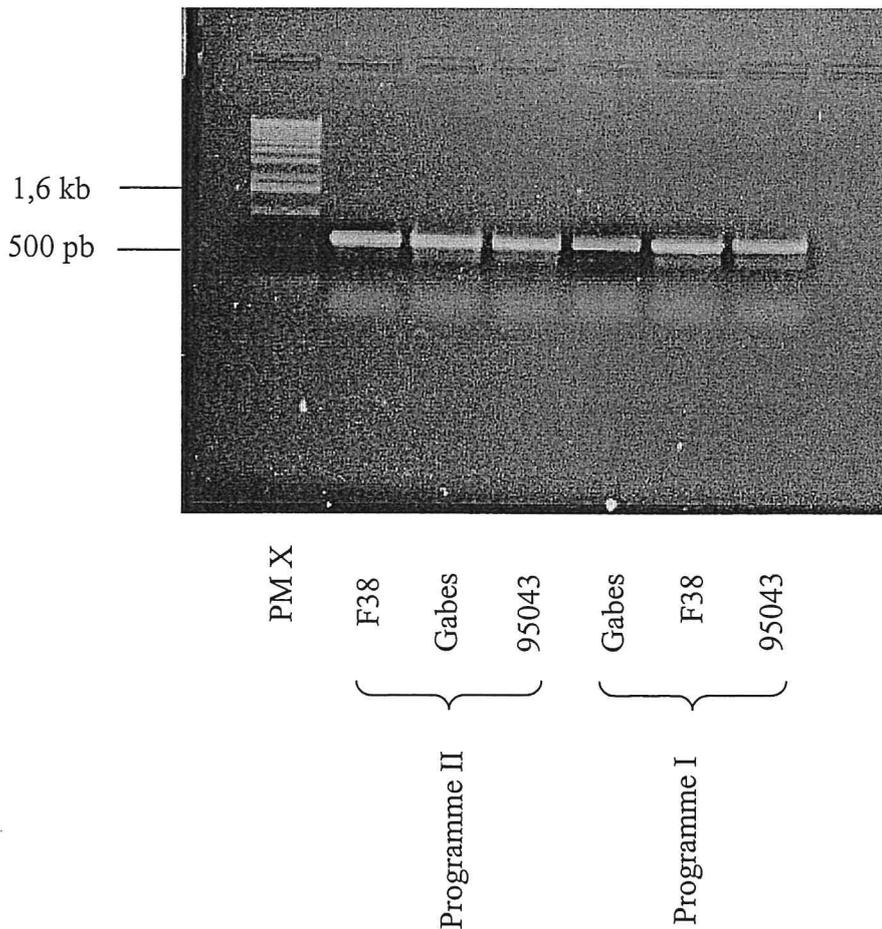
2. REA

➤ Digestion des 3 fragments amplifiés avec *Dpn* II : figure 20

➤ Digestion des fragments a et c avec 10 enzymes différentes : figures 21 à 30

3. Séquençage

➤ Séquence du fragment de 628 pb pour les souches F38 et Gabes de *Mccp* : figure 31



PM X : Marqueur de poids moléculaire X, Boehringer (Annexe 9)

Figure 17 : Résultats de l'amplification par la Taq polymérase Qiagen de l'ADN de 3 souches de *Mccp* avec le couple d'amorces LppAF/LppAR, en utilisant deux programmes différents.

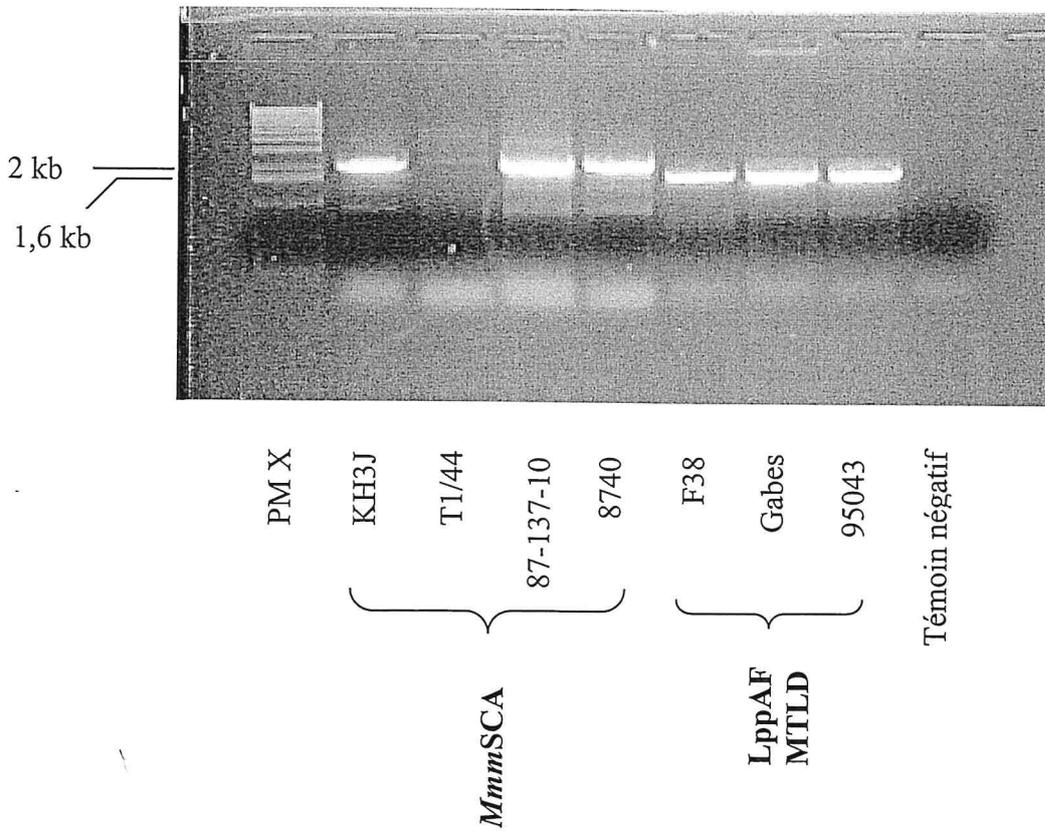


Figure 18 : Résultats de l'amplification par l'Expand™ Long Template de l'ADN de 3 souches de *MmmSC* avec l'amorce *MmmSCA* et de l'ADN de 3 souches de *Mccp* avec le couple d'amorces LppAF/MTLDR

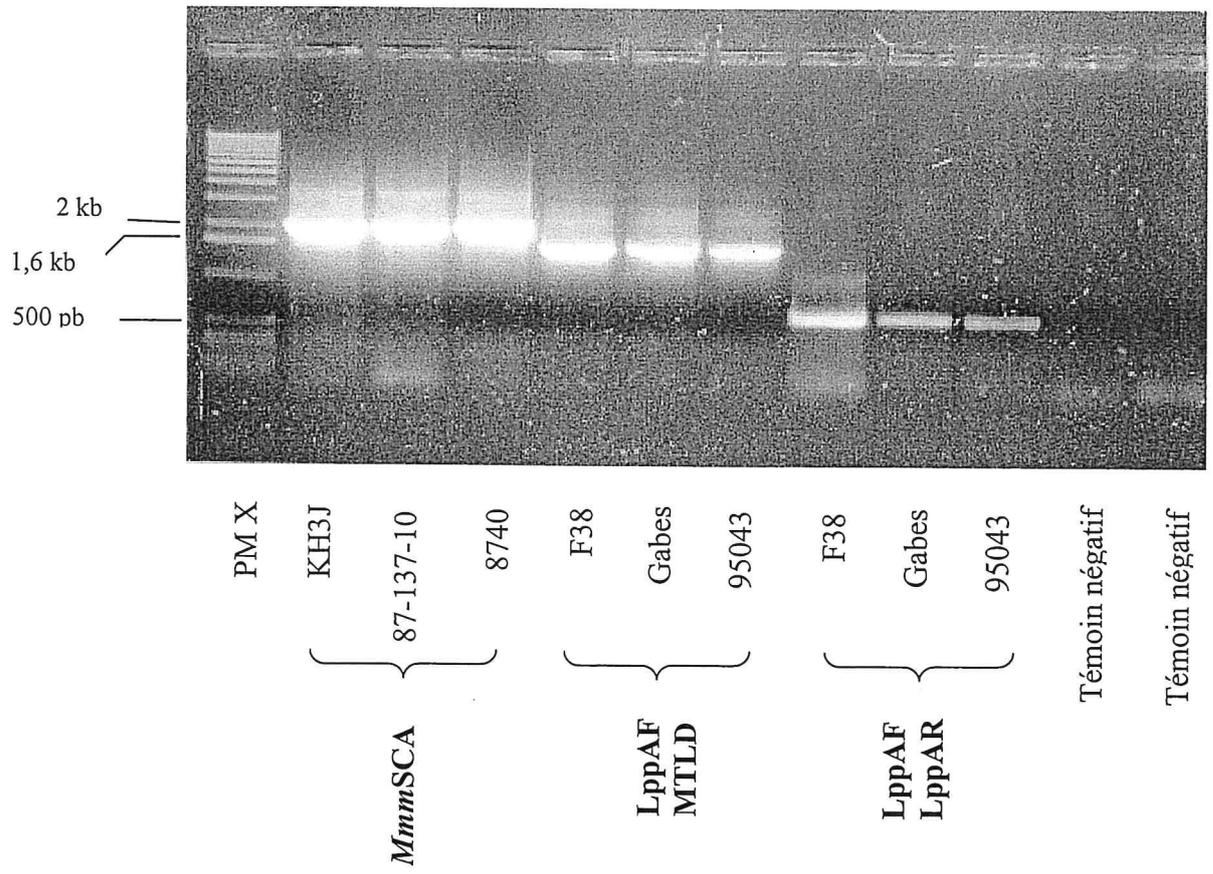
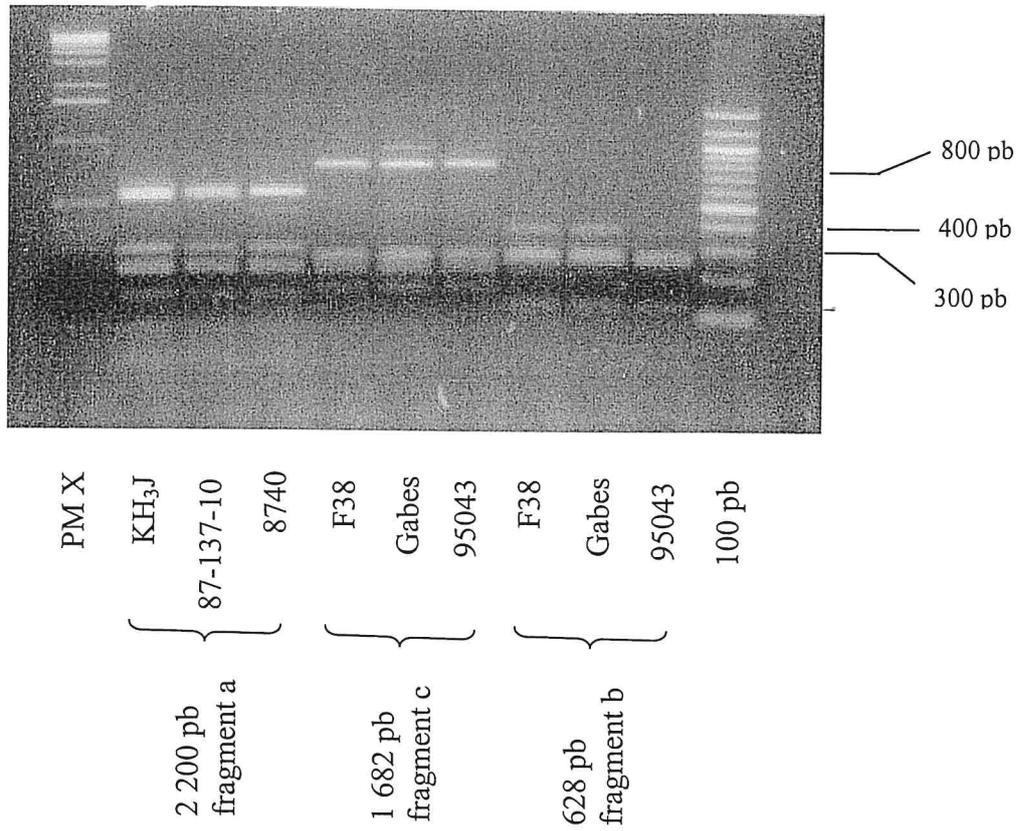


Figure 19 : Résultats de la ré-amplification des fragments d'ADN a, b et c avec les amorces correspondantes



100 pb : Marqueur de poids moléculaire 100 pb, Biolabs (Annexe 9)

Figure 20 : Résultat de la digestion par *Dpn* II des 3 fragments d'ADN issus de la ré-amplification : les fragments a, b et c.

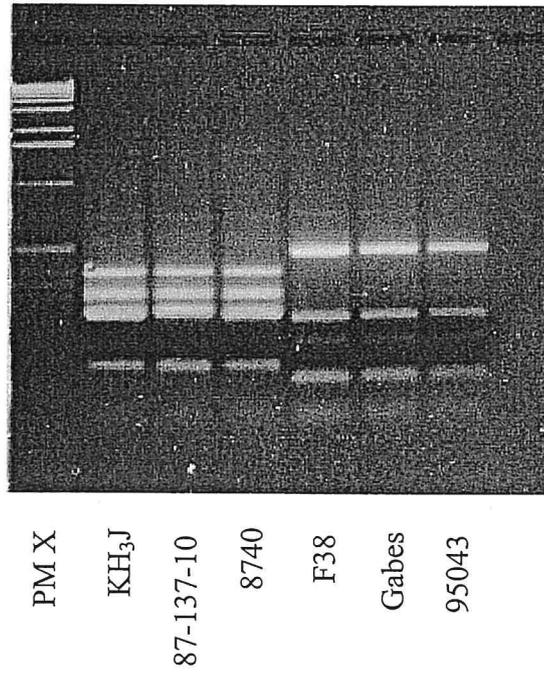
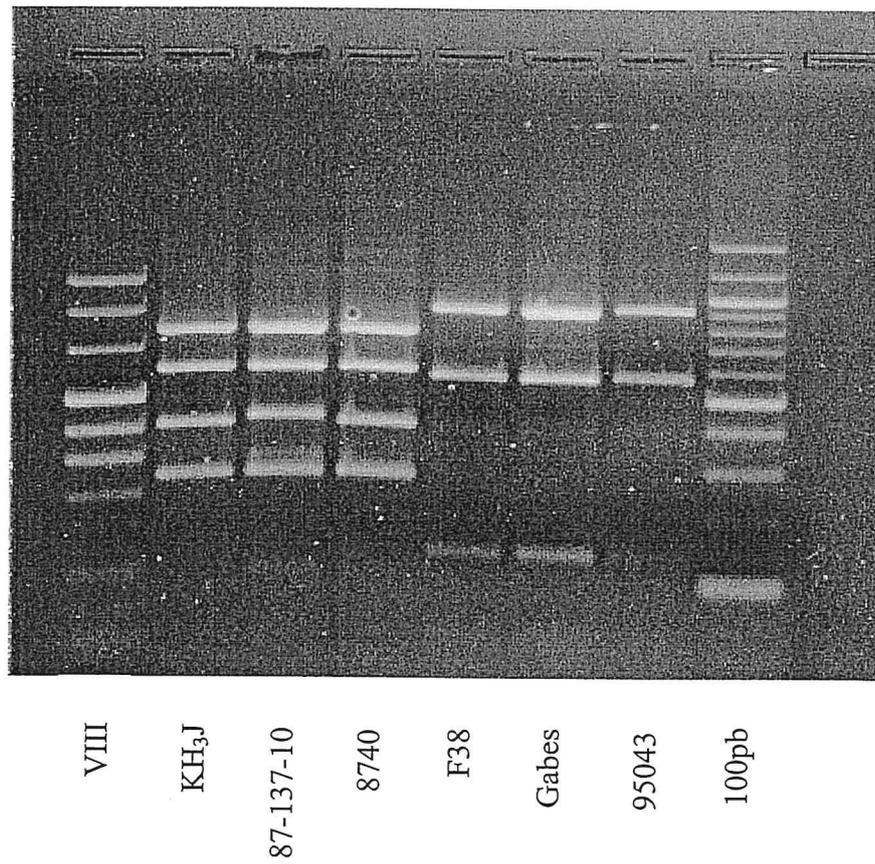
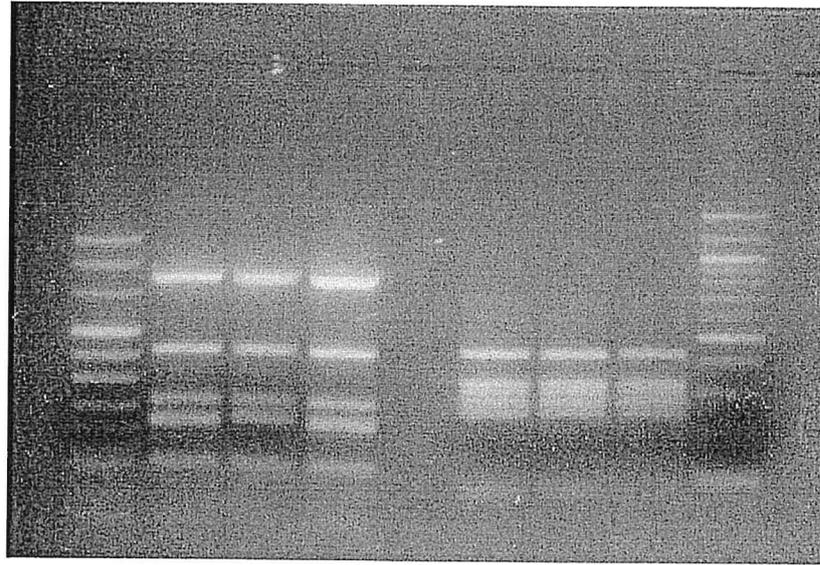


Figure 21 : Résultats de la digestion par *Mbo* II des fragments a et c.



PM VIII : Marqueur de poids moléculaire VIII, Roche (Annexe 9)

Figure 22 : Résultats de digestion par *Ase* I des fragments a et c



VIII

KH₃J

87-137-10

8740

F38

Gabes

95043

100pb

Figure 23 : Résultats de digestion par *Dra* I des fragments a et c

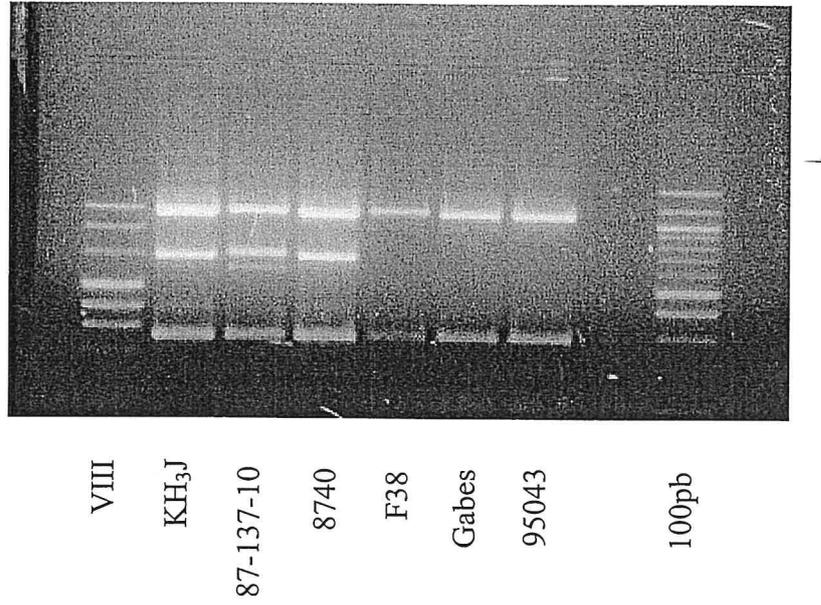


Figure 24 : Résultats de digestion par *Ssp* I des fragments a et c

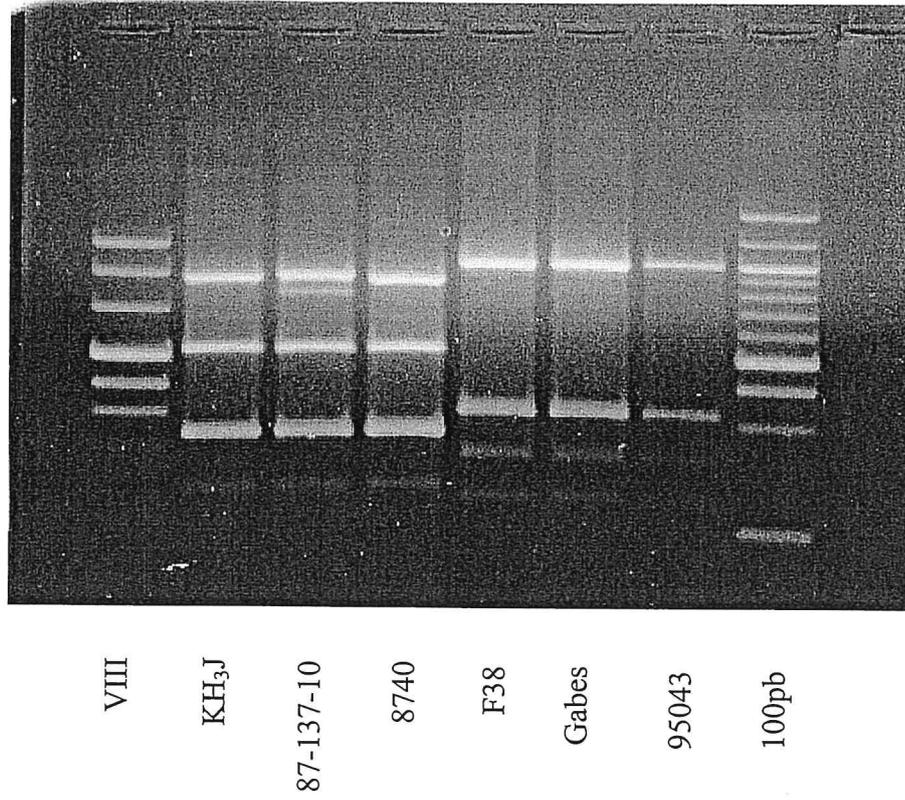


Figure 25 : Résultats de digestion par *Dde* I des fragments a et c

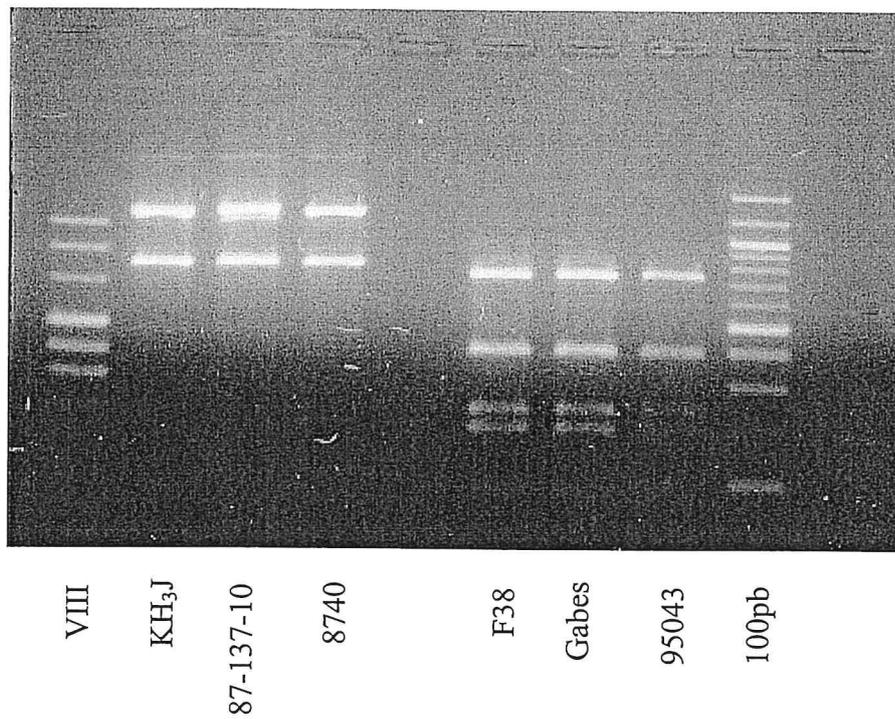


Figure 26 : Résultats de digestion par *Bsr* I des fragments a et c

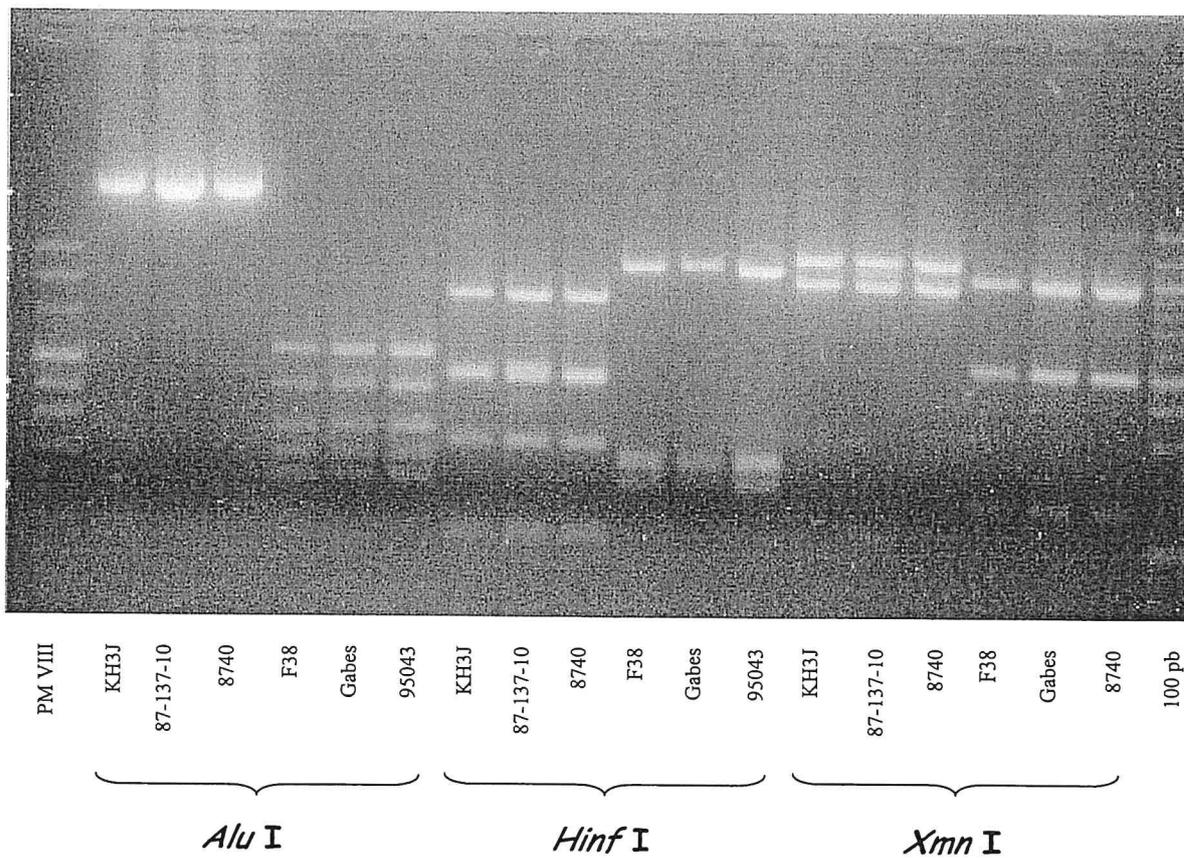
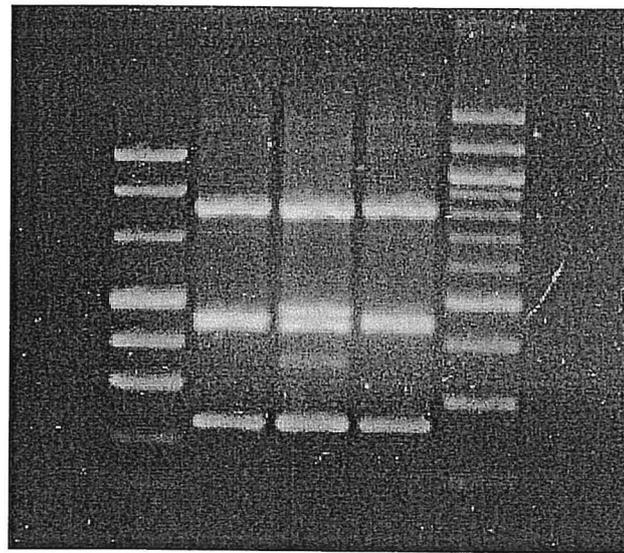


Figure 27 : Résultats de digestion par *Alu* I, *Hinf* I et *Xmn* I des fragments a et c



VIII

KH₃J

87-137-10

8740

100pb

Figure 28 : Résultats de la digestion par *Hinf*I du fragment a
Migration sur gel Metaphor à 2 % pendant 4 heures à 100 Volts

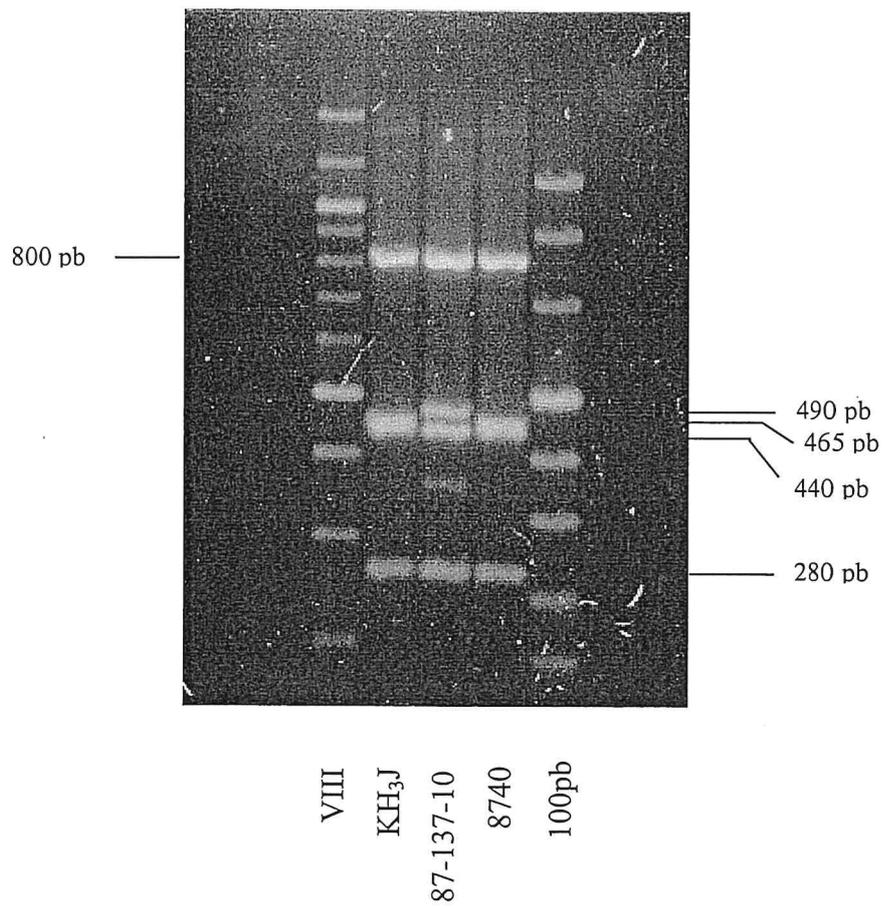


Figure 29 : Résultats de la digestion par *Hinf*I du fragment a Migration sur gel Metaphor à 2 % (Annexe 5) pendant 15 heures à 30 Volts

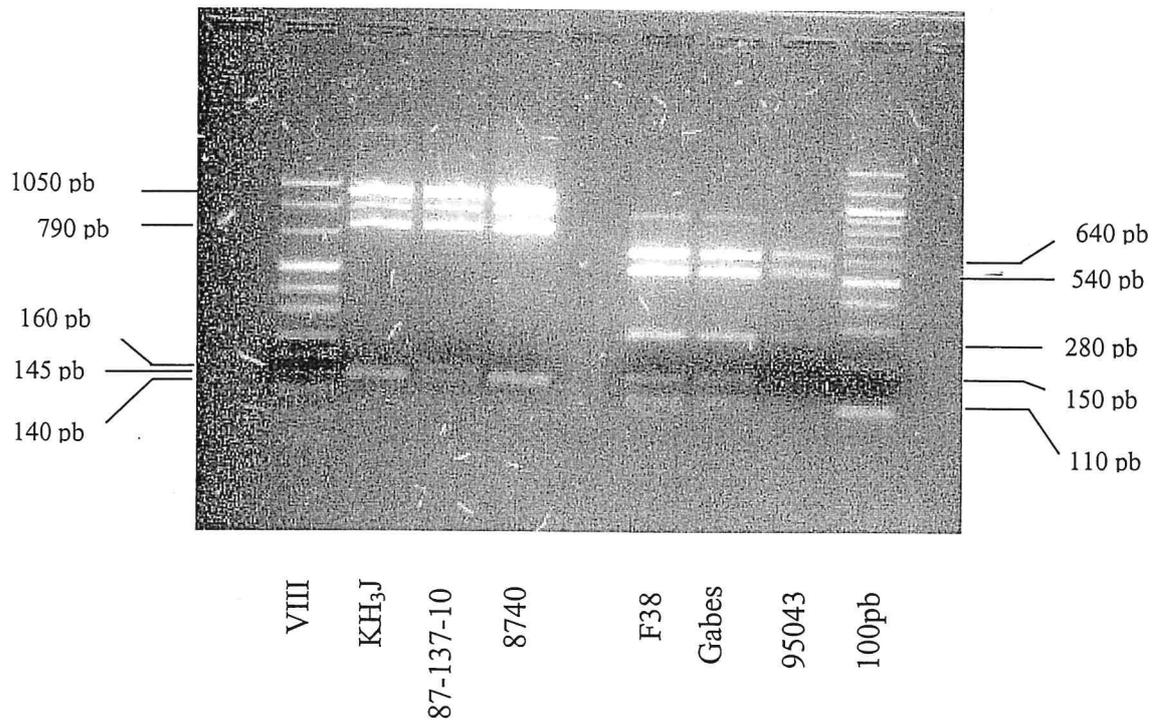


Figure 30 : Résultats de digestion par *Mae* I des fragments a et c

* ALIGNMENT OF TWO NUCLEOTIDE SEQUENCES. *

The two sequences to be aligned are:

F38LPPA001.
DE MELD CREATED BY ASSEMBL REV 2.0
Total number of bases: 573.

GABLPPA001.
DE MELD CREATED BY ASSEMBL REV 2.0
Total number of bases: 561.

Open gap cost : 10
Unit gap cost : 10

The character to show that two aligned residues are identical is '|'

```

F38LPPA001- TTTAAATCCAGTTAAAATGAATTCAAAAATTTTATATTTACTATTTTTTTG -50
              |||
GABLPPA001-      CCAGTTAAAATGAATTCAAAAATTTTATATTTACTATTTTTTTG -43

F38LPPA001- TAAATTTAATTTTAACTTTACTAATAACACCTTTGTCAAGAATAAATTCA -100
              |||
GABLPPA001- TAAATTTAATTTTAACTTTACTAATAACACCTTTGTCAAGAATAAATTCA -93

F38LPPA001- GAATTCTCATTAAAGATTTTCAAAGCTTAATTTATATTCTTTTTTTTACAGA -150
              |||
GABLPPA001- GAATTCTCATTAAAGATTTTCAAAGCTTAATTTATATTCTTTTTTTTACAGA -143

F38LPPA001- TTTGTTATTTGCATAAAAAACAGTTGTTAAGGTTGTTAAGTCGTTTTTTAA -200
              |||
GABLPPA001- TTTGTTATTTGCATAAAAAACAGTTGTTAAGGTTGTTAAGTCGTTTTTTAA -193

F38LPPA001- GAGAAAATCAAGCAGATTTAGCATCCTTATTTTTATATATTCAAGTATTA -250
              |||
GABLPPA001- GAGAAAATCAAGCAGATTTAGCATCCTTATTTTTATATATTCAAGTATTA -243

F38LPPA001- TCAAATGATAATTCTTTTTTTATTGTATTTAAATCTAAAAAATCAACATC -300
              |||
GABLPPA001- TCAAATGATAATTCTTTTTTTATTGTATTTAAATCTAAAAAATCAACATC -293

F38LPPA001- ATTTTTATGTTTCATCAGCTTGTGATGATTGGCTATGTGAGCGATCATCCG -350
              |||
GABLPPA001- ATTTTTATGTTTCATCAGCTTGTGATGATTGGCTATGTGAGCGATCATCCG -343

F38LPPA001- AGTTTGAATTATTATCATGATTGTTTTTTAGATTCTTCCATAGGTTTTACT -400
              |||
GABLPPA001- AGTTTGAATTATTATCATGATTGTTTTTTAGATTCTTCCATAGGTTTTACT -393

F38LPPA001- GATGGCTTTTCTCCAGTATCGTTAGTGTTAGGATAAATTGGTACTATTGGT -450
              |||
GABLPPA001- GATGGCTTTTCTCCAGTATCGTTAGTGTTAGGATAAATTGGTACTATTGGT -443

F38LPPA001- GCTAGTATTATTATTTTTGTTAGGTTTTTTTTCAGATTTGTTTTTTGTCTGTA -500
              |||
GABLPPA001- GCTAGTATTATTATTTTTGTTAGGTTTTTTTTCAGATTTGTTTTTTGTCTGTA -493

```

```

F38LPPA001- GTTTGC GTTCTATTAGTAGGGTTCTTACTACTTGGCTTGTTAGTATAGCA -550
             |||
GABLPPA001- GTTTGC GTTCTATTAGTAGGGTTCTTACTACTTGGCTNGTTAGTATAGCA -543
             |||
F38LPPA001- GGAAACTAAACTTAAAAGACTAA -573
             |||
GABLPPA001- GGAAACTAAACTTAAAAG -561

```

```

Identity : 560 (99.82%)
Number of gaps inserted in F38LPPA001: 0
Number of gaps inserted in GABLPPA001: 0

```

===05-JAN-2000=====NALIGN=====PC/GENE===

Figure 31 : Alignement des séquences du fragment b pour les souches F38 et Gabes de *MmmSC*.

IV. DISCUSSION

1. PCR

➤ La figure 17 montre que le rendement de l'amplification varie de façon significative selon le programme utilisé. La quantité d'ADN obtenue avec le programme II est plus importante qu'avec le programme I. En effet, pour le programme II, la température lors de l'hybridation des amorces est plus basse et le temps d'élongation est trois fois plus court. L'hybridation des amorces est donc favorisée et le rendement de la polymérase augmenté.

➤ On constate sur la figure 18 et la figure 19 que l'Expand™ Long Template amplifie avec un meilleur rendement que la Taq polymérase Qiagen. L'utilisation de la première est donc préférable en vue de réaliser une digestion enzymatique. Toutefois, le coût supérieur de cette enzyme n'autorise pas son utilisation systématique.

➤ Le rendement est également meilleur avec de l'ADN pur que directement sur une culture. Dans les mêmes conditions, on obtient après ré-amplification environ deux fois plus d'ADN, environ 2 µg, pour les souches de *MmmSC*, amplifiés à partir d'ADN pur, que pour les souches de *Mccp*, amplifiées directement à partir d'une culture (figure 19). Pour les digestions, on utilisera donc un volume deux fois plus important des produits PCR de *Mccp*.

➤ Les contrôles négatifs montrent qu'il n'y a pas eu de contamination lors de l'amplification (figure 18) et de la ré-amplification (figure 19).

2. REA

➤ Sur la figure 20, on voit que l'enzyme *Dpn II* n'a pas montré de variation pour le fragment c de 1 682 pb et pour le fragment b de 628 pb, qui représente une portion du fragment c. Le fragment b a été abandonné pour la suite des expérimentations. En effet, les bandes fluorescentes issues de la digestion du fragment b sont difficilement visualisables en raison de la faible quantité d'ADN disponible avant la digestion. De plus, si la variabilité n'est pas très importante pour le fragment c de 1 682 pb, elle sera forcément encore plus réduite sur le fragment b de 628 pb. La digestion avec *Dpn II* ne donne aucune différence entre les souches de *MmmSC* et de *Mccp*. Cette enzyme ne possède donc pas de site de coupure dans une zone du génome variable d'une souche à l'autre. Pour le fragment c, la digestion donne 5 fragments dont la somme équivaut effectivement à 1 682 pb.

➤ Le poids moléculaire X utilisé dans la figure 21 n'est pas suffisamment précis pour déterminer la taille des fragments avec précision.

➤ De même qu'avec *Dpn II*, on n'observe aucune différence entre les souches avec les enzymes *Mbo II*, *Ase I*, *Dra I*, *Ssp I*, *Dde I*, *Bsr I*, *Alu I* et *Xmn I* (figures 21 à 27). La somme des poids moléculaires des bandes observées après la digestion avec chacune de ces enzymes correspond bien aux poids moléculaires respectifs des fragments a et c non digérés.

➤ La digestion par *Hinf* I donne une différence pour la souche burkinabe 87-137-10 de *MmmSC*. Cette différence est représentée avec des temps de migration différents (figures 27 à 29) et à l'aide d'un gel procurant une meilleure résolution (figures 28 et 29). *Hinf* I a donc mis en évidence une mutation sur la souche burkinabe. La figure 32 donne une interprétation possible des deux types de profils de restriction obtenus avec cette enzyme.

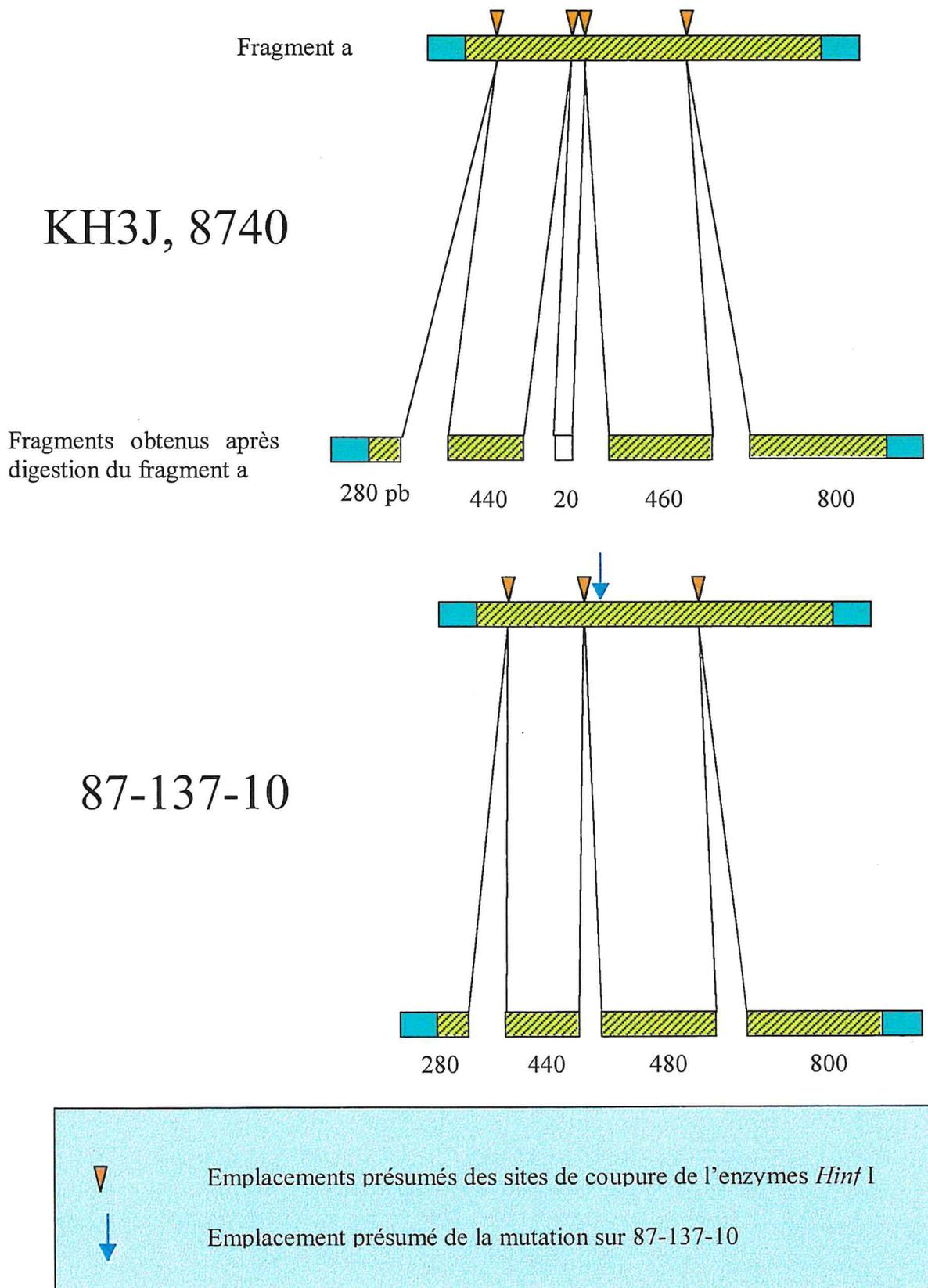


Figure 32 : Représentation schématique de la différenciation de 87-137-10 par restriction enzymatique avec *Hinf*I

➤ Le même type de différence a été observée avec l'enzyme de restriction *Mae* I. Comme avec *Hinf* I, la souche burkinabe se distingue des deux autres souches de *Mmm*SC (figure 30). Cette distinction est cependant moins visible en raison de la superposition des bandes fluorescentes et du bleu de charge sur le gel. Ceci est lié au poids moléculaire des fragments différenciant 87-137-10 : ces fragments sont plus petits que ceux obtenus avec *Hinf* I. Pour mieux mettre en évidence la différenciation de la souche burkinabe avec *Mae* I, il faudrait renouveler la digestion et laisser migrer les fragments sur un gel plus résolutif pendant plus de temps. Cependant, cette enzyme est très coûteuse, ce qui limite le nombre d'expérimentations réalisables.

➤ Pour le fragment c, résultat de l'amplification du gène *lppA*, aucune différence entre les trois souches de *Mccp* testées n'a été observée après digestion. Les 11 enzymes utilisées ont permis d'explorer 189 nucléotides. Ceci correspond à 11,2 % des nucléotides du fragment c. Il est donc possible que des mutations soient présentes sur le fragment c et qu'elle se situent parmi les 88,8 % de nucléotides non explorés. Toutefois, si l'on suppose que le fragment c comporte 5 % de polymorphisme et que les sites de coupure sont répartis aléatoirement sur ce fragment, la probabilité de ne pas détecter de mutation lors de notre étude était de $3,41 \times 10^5$. Nous pouvons donc aussi envisager qu'il n'y ait pas ou très peu de polymorphisme sur le fragment c, contrairement aux 5 % attendus.

3. Séquençage

➤ La séquence du fragment b la souche 95043 n'a pas pu être déterminée en raison de la trop faible quantité d'ADN disponible pour cette souche.

➤ L'alignement des séquences de F38 et Gabes n'a décelé aucune différence entre ces deux souches. Les fragments b de ces deux souches sont donc strictement identiques (figure 31). Ce résultat est en accord avec l'absence de différence observée pour les profils de restriction des fragments b et c.

➤ Le séquençage a permis de démontrer que l'absence de différence de profil de restriction était due à l'absence de polymorphisme du gène *lppA*, en tout cas pour le fragment b.

➤ Il serait intéressant de séquencer le fragment a de la souche burkinabe. Après alignement avec les séquences déjà connues, on pourrait ainsi visualiser précisément le nombre et la localisation des mutations. Le séquençage de ce fragment sur plusieurs souches de *Mmm*SC pourrait constituer la base d'un arbre phylogénétique entre ces souches.

CONCLUSION

L'utilisation de deux méthodes complémentaires pour tester deux marqueurs d'épidémiologie moléculaire potentiels pour la PPCB et la PPCC respectivement a permis d'établir les conclusions suivantes :

◇ L'existence de différences entre la souche burkinabe 87-137-10 et les deux autres souches de *MmmSC* testées, au niveau d'une portion de génome d'environ 2,2 kb (fragment a). Cette portion du génome de *MmmSC* semble donc comporter un polymorphisme permettant son utilisation comme marqueur moléculaire. Elle comporte également des zones conservées permettant son amplification pour la plupart des souches.

◇ L'absence de différence par PCR-REA entre trois souches de *Mccp* d'origines distinctes au niveau d'une portion de génome d'environ 1,68 kb (fragment c). Cette absence de polymorphisme a été confirmée par le séquençage d'une partie du fragment c de 628 pb (fragment b), pour les souches F38 et Gabes. Il semble donc que le gène *lppA* ne soit pas un bon candidat comme marqueur d'épidémiologie moléculaire, contrairement à l'hypothèse de départ. Toutefois, pour vérifier l'absence de polymorphisme sur ce gène, il faudrait déterminer la séquence du fragment c en entier pour plusieurs souches.

Ces résultats sont inattendus et opposés à nos prévisions :

➤ Nous pensions déceler un polymorphisme sur le pseudo-gène *lppA*, puisqu'il n'est pas exprimé. Effectivement, l'absence de pression de sélection sur une portion d'ADN non exprimée permet à toute mutation de persister. Le taux de mutation est alors constant et la distance évolutive entre deux souches est proportionnelle au nombre de ces mutations. De plus, l'équipe suisse annonçait une différence approximative de 5 % entre les séquences du pseudo-gène *lppA* des souches F38 et Gabes (Frey, communication personnelle). Les résultats n'ont pas confirmé ces suppositions. Deux explications sont possibles :

- L'hypothèse de départ est fautive et il n'y a effectivement aucun polymorphisme sur le pseudo-gène *lppA*. Dans ce cas, cette portion génomique ne peut pas servir de marqueur d'épidémiologie moléculaire.
- Le polymorphisme se situe en dehors des 628 pb séquencées et en dehors des 11,2 % des nucléotides explorés par la PCR-REA.

➤ Les souches de *MmmSC* sont connues pour être très peu polymorphes par rapport aux souches de *Mccp* ou des autres membres du "groupe Mycoïdes". La variabilité au sein de cette sous-espèce n'a été mise en évidence que récemment par des techniques lourdes, complexes, difficiles à standardiser et irréalisables dans un laboratoire de diagnostic. Il est donc possible, pour la première fois, de différencier des souches de *MmmSC* avec une technique rapide, simple et facilement reproductible. La PCR-REA représente donc un outil d'épidémiologie moléculaire utilisable dans des laboratoires peu équipés. Elle peut se réaliser sur des prélèvements de terrain, de la même façon qu'une PCR de diagnostic.

Par la suite, le séquençage du fragment a de *MmmSC* pour plusieurs souches de diverses origines permettra d'analyser précisément la variabilité de cette portion génomique. Possédant les différentes séquences, il sera alors possible, avec un logiciel spécifique, de déterminer les enzymes à utiliser lors d'une PCR-REA pour différencier certaines souches. La PCR-REA pourrait ensuite être introduite sur le terrain afin de déterminer rapidement l'origine de certains foyers. En Zambie, par exemple, certains foyers de PPCB sont originaires de Tanzanie, à l'Est, et d'autres d'Angola, à l'Ouest. La différenciation par PCR-REA des deux types de souches, tanzaniennes ou angolaises, procurerait un moyen idéal de traçabilité. Les implications dans la prophylaxie sont importantes. En effet, en connaissant l'origine de l'infection, on peut facilement focaliser les mesures sanitaires sur certaines zones sensibles.

BIBLIOGRAPHIE

1. 1990. Recommendations of the workshop on production and quality control of contagious bovine pleuropneumonia vaccine in Africa convened by the Pan African Veterinary Vaccine Center (PANVAC), Bamako, Mali, 12-16 novembre 1990.
2. Bascunana C.R., Mattsson J.G., Bolske G., Johansson K.E., 1994. Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma sp.* strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J.Bacteriol.*, **176** (9) : 2577-2586.
3. Bashiruddin J.B., Taylor T.K., Gould A.R., 1994. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *J.Vet.Diagn.Invest*, **6** (4) : 428-434.
4. Brown P.D., Levett P.N., 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J.Med.Microbiol.*, **46** (2) : 173-181.
5. Cheng X., Nicolet J., Miserez R., Kuhnert P., Krampe M., Pilloud T., Abdo E.M., Griot C., Frey J., 1996. Characterization of the gene for an immunodominant 72 kDa lipoprotein of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Microbiology*, **142** (Pt 12) : 3515-3524.
6. Cheng X., Nicolet J., Poumarat F., Regalla J., Thiaucourt F., Frey J., 1995. Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology*, **141** (Pt 12) : 3221-3228.
7. Citti C., Rosengarten R., 1997. Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. *Wien.Klin.Wochenschr.*, **109** (14-15) : 562-568.
8. Costas M., Leach R.H., Mitchelmore D.L., 1987. Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the '*Mycoplasma mycoides* cluster'. *J.Gen.Microbiol.*, **133** (Pt 12) : 3319-3329.
9. Cottew G.S., Breard A., Damassa A.J., Erno H., Leach R.H., Lefevre P.C., Rodwell A.W., Smith G.R., 1987. Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr.J.Med.Sci.*, **23** (6) : 632-635.
10. Cottew G.S., Yeats F.R., 1978. Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. *Aust.Vet.J.*, **54** (6) : 293-296.
11. Curasson G., 1942. Péripleurmonie bovine. In : Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée. Paris, France, Vigot Frères eds, p. 276-353.

12. Damassa A.J., Wakenell P.S., Brooks D.L., 1992. Mycoplasmas of goats and sheep. *J.Vet.Diagn.Invest*, **4** (1) : 101-113.
13. Delafond O., 1844. Traité sur la maladie de poitrine du gros bétail, connue sous le nom de Péripleurésie Contagieuse. Paris, France, Ancienne Maison Béchét jeune, 319 p.
14. Fan H.H., Kleven S.H., Jackwood M.W., Johansson K.E., Pettersson B., Levisohn S., 1995. Species identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, **39** (2) : 398-407.
15. Frey J., Cheng X., Kuhnert P., Nicolet J., 1995. Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas. *Gene*, **160** (1) : 95-100.
16. Frey J., Cheng X., Monnerat M.P., Abdo E.M., Krawinkler M., Bolske G., Nicolet J., 1998. Genetic and serological analysis of the immunogenic 67-kDa lipoprotein of *Mycoplasma sp.* bovine group 7. *Res.Microbiol.*, **149** (1) : 55-64.
17. Frey J., Nicolet J., 1997. Molecular identification and epidemiology of animal mycoplasmas. *Wien.Klin.Wochenschr.*, **109** (14-15) : 600-603.
18. Johansson K.E., Persson A., Persson M., 1997. Diagnosis of contagious caprine and contagious bovine pleuropneumonia by PCR and Restriction Enzymatic Analysis. In : International Symposium on Diagnosis and control of Livestock Diseases using Nuclear and Related Techniques. Uppsala, Sweden, Department of Bacteriology, National Veterinary Institute.,
19. Kaplan J.C., Delpech M., 1993b. Détermination de la séquence d'un acide nucléique. In : Flammarion eds: Biologie moléculaire et médecine. 2ème, p. 644
20. Kaplan J.C., Delpech M., 1993a. Les outils enzymatiques du génie génétique. In : Flammarion eds: Biologie moléculaire et médecine. 2ème, p. 577
21. Le Goff C., Thiaucourt F., 1998. A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet.Microbiol.*, **60** (2-4) : 179-191.
22. Leach R.H., Costas M., Mitchelmore D.L., 1989. Relationship between *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* ('large- colony' strains) and *M. mycoides* subsp. *capri*, as indicated by numerical analysis of one-dimensional SDS-PAGE protein patterns. *J.Gen.Microbiol.*, **135** (Pt 11) : 2993-3000.
23. Leach R.H., Erno H., Macowan K.J., 1993. Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Barile, Edward, Theodore, and Erno 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **43** (3) : 603-605.

24. Macowan K.J., Minette J.E., 1976. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop.Anim Health Prod.*, **8** (2) : 91-95.
25. Marsh I., Whittington R., Cousins D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol.Cell Probes*, **13** (2) : 115-126.
26. Masiga W.N., Domenech J., 1995. Overview and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev.Sci.Tech.*, **14** (3) : 611-630.
27. Masiga W.N., Domenech J., Windsor R.S., 1996. Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev.Sci.Tech.*, **15** (4) : 1283-1308.
28. Mattsson J.G., Johansson K.E., 1993. Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA for rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *FEMS Microbiol.Lett.*, **107** (2-3) : 139-144.
29. Monnerat M.P., Thiaucourt F., Nicolet J., Frey J., 1999a. Comparative analysis of the lppA locus in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Vet.Microbiol.*, **69** (3) : 157-172.
30. Monnerat M.P., Thiaucourt F., Poveda J.B., Nicolet J., Frey J., 1999b. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, **6** (2) : 224-230.
31. Morace G., Pagano L., Sanguinetti M., Posteraro B., Mele L., Equitani F., D'Amore G., Leone G., Fadda G., 1999. PCR-restriction enzyme analysis for detection of Candida DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J.Clin.Microbiol.*, **37** (6) : 1871-1875.
32. Nadew M., 1999. Epidémiologie moléculaire de la péripleurmonie contagieuse bovine (PPCB). In : Mémoire de Maîtrise es-Sciences, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France.
33. Nocard, Roux, 1898. Le microbe de la péripleurmonie. *Bulletin de la Société Centrale de Médecine Vétérinaire*,
34. O.I.E., 1999. Situation zoosanitaire mondiale en 1998. In : 67ème Session Générale du Comité International de l'Office International des Epizooties, Paris, France, 17-21 mai 1999.
35. Olsen G.J., Woese C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.*, **7** (1) : 113-123.
36. Pettersson B., Bolske G., Thiaucourt F., Uhlén M., Johansson K.E., 1998. Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains, based on polymorphisms in the 16S rRNA genes - Evolution moléculaire des types de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, basée sur les polymorphismes dans les gènes rRNA 16S. *Journal of Bacteriology (USA)*,

37. Pettersson B., Leitner T., Ronaghi M., Bolske G., Uhlen M., Johansson K.E., 1996. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J.Bacteriol.*, **178** (14) : 4131-4142.
38. Poumarat F., Solsona M., 1995. Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony, the agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet.Microbiol.*, **47** (3-4) : 305-315.
39. Provost A., Perreau P., Bréard A., Le G.C., Martel J.L., Cottew G.S., 1987. Contagious bovine pleuropneumonia - Péripleurmonie contagieuse bovine. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (FRA)*,
40. Raue R., Hess M., 1998. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J.Virol.Methods*, **73** (2) : 211-217.
41. Razin S., 1997. Comparative genomics of mycoplasmas. *Wien.Klin.Wochenschr.*, **109** (14-15) : 551-556.
42. Rodriguez J.L., Ermel R.W., Kenny T.P., Brooks D.L., Damassa A.J., 1997. Polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion for selected members of the "*Mycoplasma mycoides* cluster" and *Mycoplasma putrefaciens*. *J.Vet.Diagn.Invest*, **9** (2) : 186-190.
43. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230** (4732) : 1350-1354.
44. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **74** (12) : 5463-5467.
45. Thiaucourt,F., 1994. La Pleuropneumonie Contagieuse Caprine. Thèse doct. Médecine Vétérinaire, Université Paris XII, Paris, France, p. 347 p.-
46. Thiaucourt F., Bolske G., Leneguersh B., Smith D., Wesonga H., 1996. Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia. *Rev.Sci.Tech.*, **15** (4) : 1415-1429.
47. Thiaucourt F., Bölske G., 1996. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats - [Pleuropneumonie contagieuse caprine et autres mycoplasmoses pulmonaires des ovins et caprins]. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (FRA)*,
48. Thiaucourt F., Lorenzon S., David A., Tulasne J.J., Domenech J., 1998. Vaccination against contagious bovine pleuropneumonia and the use of molecular tools in epidemiology. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* , **849** : 146-151.
49. Thomas P., 1873. Rapport médical sur le Bou Frida. *In* : Publication du gouvernement général civil de l'Algérie. Alger, A. Jourdan eds., p. 35 p.-

50. Tibayrenc M., 1998a. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int.J.Parasitol.*, **28** (1) : 85-104.
51. Tibayrenc M., 1998b. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, **93** (5) : 577-580.
52. Unnerstad H., Nilsson I., Ericsson H., Danielsson-Tham M.L., Bille J., Bannerman E., Tham W., 1999. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl.Environ.Microbiol.*, **65** (5) : 2054-2056.
53. Vilei E.M., Nicolet J., Frey J., 1999. IS 1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small- colony type. *J.Bacteriol.*, **181** (4) : 1319-1323.
54. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J.Bacteriol.*, **173** : 697-703.
55. Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., Van Etten J., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J.Bacteriol.*, **171** (12) : 6455-6467.
56. Woese C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.*, **51** (2) : 221-271.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Culture de mycoplasme et extraction d'ADN total

MISE en CULTURE

- à partir d'une bille

Ensemencement dans un tube contenant 4,5 ml de milieu de Hayflick complété

- à partir d'une souche lyophilisée

Reprendre la souche dans 1 ml d'eau, prélever 300 µl

Ensemencer en dilution dans des tubes contenant 2,7 ml de milieu de Hayflick complété

☞ ☆ Incuber les tubes à 37°C pendant 48 à 72 h

☆ Dans un flacon de 150 ml, ensemencer 100 ml de milieu de Hayflick complété par 2 ml du dernier tube après avoir vérifié l'état de la culture au microscope

☆ Laisser la culture 48 à 72 h à 37°C (culture en phase exponentielle)

☆ Placer la culture à + 4°C pendant 3 à 5 jours (facultatif)

☆ Centrifuger 30 mn à 10 000 rpm (14 000 g)

☆ Après avoir retiré le surnageant, ajouter au culot 25 ml de PBS 1X

☆ Centrifuger 30 mn à 10 000 rpm

☆ Ajouter au culot 4 à 5 ml de PBS 1X (=x')

☆ Ajouter 50x' µl de SDS 10 %

EXTRACTION

☆ (2 ml de souche lavée + 100 µl de SDS 10 %) + 20 µl de protéinase K à 20 mg/ml : mélanger par retournement jusqu'à transparisation totale

☆ Incuber minimum 1 h à 37°C

☆ Préparer des tubes Eppendorf

☆ Pour chaque tube, prélever avec une pipette de 1 ml 600 µl et ajouter 100 µl de solution d'acétate de sodium 3 M ph 5,5

☆ Sous hotte, ajouter 700 µl de phénol chloroforme isoamylalcool 25 : 24 : 1

☆ Agiter 3 à 4 mn le tube par retournement afin d'obtenir une phase laiteuse

☆ Centrifuger 10 mn à 13 000 rpm

☆ Prélever le surnageant avec un cône coupé pour ne pas casser l'ADN et le mettre dans un tube Eppendorf. Il ne faut pas entraîner la galette de protéine

☆ Ajouter 700 µl de chloroforme isoamylalcool 24 : 1

☆ Agiter 3 à 4 mn par retournement

☆ Centrifuger 10 mn à 13 000 rpm

☆ Prélever les surnageants et les rassembler dans un tube

☆ Ajouter 0,6 volume d'isopropanol conservé à -20°C

☆ Retourner plusieurs fois le tube : apparition de la pelotte d'ADN

☆ Prélever l'ADN avec une anse stérile

☆ Tremper l'ADN dans une solution d'éthanol 70 %

☆ Déposer l'ADN dans un tube et laisser sécher (il se transparise)

☆ Reprendre par x µl de TE suivant la taille de la pelotte

☆ Laisser l'ADN se dissoudre à + 4°C puis le conserver à - 20°C

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

ANNEXE 2 : Mélange réactionnel des dNTP utilisés en PCR

d NTP Mixture

d ATP 100mM = 30 µl
d TTP100mM = 30 µl
d GTP100mM = 15 µl
d CTP 100mM = 15 µl
Distilled water = 10µl

The proportion of dNTP vary because the *mycoplasma* genome is composed of 75% of A and T.

ANNEXE 3: Séquence des oligonucléotides utilisés comme amorce pour l'amplification par PCR des fragments a, b et c (livrés par Genset SA)

MmmSCA : 5'-AAGCTTTAGATATTTTAATGTATTTAATGG-3'

MTLDR : 5'-TTCTAACAATTTTAGATTATGC-3'

LPPAF : 5'-TTACTACTATCTATTTTACC-3'

LPPAR : 5'-TAATGTCTTTTTCATTATCTAC-3'

ANNEXE 4 : Protocole d'utilisation de l'Expand™ Long Template

BOEHRINGER MANNHEIM

Expand™ Long Template PCR System

Deoxynucleoside-triphosphate:

DNA deoxynucleotidyltransferase, E.C. 2.7.7.7

Cat. No. 1681 834 100 units for approx. 38 reactions

Cat. No. 1681 842 500 units (2 x 250 units) for approx. 190 reactions

Cat. No. 1759 060 2500 units (10 x 250 units) for approx. 950 reactions

Product description

Expand™ Long Template PCR System is composed of a unique enzyme mix containing thermostable Taq and Pwo DNA polymerases. This powerful polymerase mixture is designed to give a high yield of PCR products from episomal and genomic DNA. It amplifies fragments up to 27 kb from human genomic DNA and up to 40 kb from λDNA.

Storage and dilution buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C), 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.5% (v/v) Tween® 20*, 0.5% (v/v) Nonidet® P40*, 50% glycerol (v/v).

Volume activity: 3.5 x 10³ units/ml

Stability: The undiluted enzyme mix is stable when stored at -20°C.

Supplied buffers:

- 1 PCR buffer 10x conc. with 17.5 mM MgCl₂
- 2 PCR buffer 10x conc. with 22.5 mM MgCl₂
- 3 PCR buffer 10x conc. with 22.5 mM MgCl₂ and detergents:

Note: Thaw and equilibrate at room temperature especially buffer 3, then mix thoroughly.

General protocol for DNA amplification

We recommend to prepare two separate master mixes:

The preparation of 2 separate master mixes circumvents the need of hot start and in addition avoids that the enzyme mix interacts with primers or template without dNTPs which could lead to a partial degradation of primer and template through the 3'-5' exonuclease activity of Pwo.

Note: Do not use AmpliWax, because a proper mixing of the two layers after melting of AmpliWax in 0.2 ml caps is not given, therefore none or only little yield is possible.

Add to a microfuge tube on ice:

Application protocol

General advice

We recommend to read the entire pack insert carefully before use of the product.

Amplification with Expand™ Long Template PCR System is very robust up to 12 kb (genomic DNA); amplification between 12 and 20 kb (genomic DNA) is more critical concerning setting up, template quality, denaturation conditions, proper conditions for dNTP/Mg concentrations. Amplification larger than 20 kb (genomic DNA) needs even more optimization efforts.

Please note:

- use 0.2 ml thin-walled PCR tubes*, Cat. No. 1667 041.
- prepare two separate master mixes for each reaction. The final reaction volume has to be 50 µl.
- overlay the reaction with 30 µl mineral oil.
- use an elongation temperature of 68°C.
- use combinations of 1.75 mM MgCl₂ with 350 µM dNTPs and of 2.25 mM MgCl₂ with 500 µM dNTPs.
- design primer that allow annealing temperatures around 65°C. Human tPA control primers for the amplification of 4.8, 9.3 and 15 kb are available under Cat. No. 1691 104.
- the quality of the template has a tremendous effect on the success of amplification. Human genomic DNA especially tested for Expand™ Long Template PCR System is available under Cat. No. 1691 112.
- keep denaturation steps as short as possible and denaturation temperature as low as possible.

When difficulties in amplification are expected, this system 3 is the system of choice for all fragment length.

Amplification of human gen. DNA, Amplification of IDNA	0.5-12 kb system 1 0.5-25 kb		12-15 kb system 2 25-30 kb		> 15 kb system 3 > 30 kb	
	Volume	Final concentr.	Volume	Final concentr.	Volume	Final concentr.
master mix 1: add sterile redist. H ₂ O		up to 25 µl		up to 25 µl		up to 25 µl
dATP, 10 mM	1.75 µl	350 µM	2.5 µl	500 µM	2.5 µl	500 µM
dCTP, 10 mM	1.75 µl	350 µM	2.5 µl	500 µM	2.5 µl	500 µM
dGTP, 10 mM	1.75 µl	350 µM	2.5 µl	500 µM	2.5 µl	500 µM
dTTP, 10 mM	1.75 µl	350 µM	2.5 µl	500 µM	2.5 µl	500 µM
downstream primer	x µl	300 nM	x µl	300 nM	x µl	300 nM
upstream primer	x µl	300 nM	x µl	300 nM	x µl	300 nM
template DNA*	x µl	up to 500 ng genom. or 10 ng plasmid	x µl	up to 500 ng genom. or 10 ng plasmid	x µl	up to 500 ng genom. or 10 ng plasmid
master mix 2: add sterile redist. H ₂ O 10x PCR buffer with MgCl ₂	5 µl	up to 25 µl buffer 1 (1.75 mM)	5 µl	up to 25 µl buffer 2 (2.25 mM)	5 µl	up to 25 µl buffer 3 (detergents, 2.25 mM)
enzyme mix (supplied)	0.75 µl*		0.75 µl*		0.75 µl*	

* details see under general hints.

Note: Instead of using single dNTP solutions the PCR Nucleotide Mix (Cat. No. 1581 295) can be used.

ANNEXE 5 : Différents gels utilisés pour l'électrophorèse de fragments d'acide nucléique

DNA & RNA ≥ 1 kb

<i>Analytical</i>	SeaKem LE	Southern and Northern blots
	i.D.NA	Southern and Northern blots • <i>Certified</i> DNA identity testing
	FastLane	High gel strength • Low concentration gels • High DNA mobility • PFGE resolving gel • Southern and Northern blots
<i>Preparative</i>	SeaKem GTG	Southern and Northern blots • Recovery of DNA and RNA • <i>Certified</i> Recovered DNA tested for compatibility with ligation and restriction digestion
	SeaPlaque Low Melt	Recovery of DNA and RNA
	SeaPlaque GTG Low Melt	Recovery of DNA and RNA • In-gel PCR and sequencing • <i>Certified</i> In-gel cloning, restriction, and labeling
	SeaKem Gold	High gel strength • Low concentration gels • High DNA mobility • PFGE resolving gel • Southern and Northern blots • <i>Certified</i> Recovered DNA tested for compatibility with ligation and restriction digestion

DNA & RNA ≤ 1 kb

<i>Analytical</i>	NuSieve 3:1	Resolution of small DNA, RNA, and PCR fragments • Southern and Northern blots
	MetaPhor	Resolution of small DNA and PCR fragments down to 4 bp size difference • Separation of tetranucleotide repeats (STRs)
<i>Preparative</i>	NuSieve GTG Low Melt	Resolution of small DNA, RNA, and PCR fragments • Recovery of DNA and RNA • In-gel PCR, labeling, restriction, and sequencing • <i>Certified</i> In-gel cloning

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

ANNEXE 6 : Réactifs utilisés en électrophorèse

TBE 10x :

108 g Tris base
55 g acide borique
40 ml EDTA pH 8 – 0,5 M
Qsp 1 litre

TAE 10x :

242 g Tris base
57,1 ml acide acétique glacial
37,2 g Na₂EDTA, 2 H₂O
Qsp 1 litre
Concentration utilisée pour le tampon électrophorèse : 1x

Bleu de charge :

65% de sucrose
0,25% de Bleu de Bromophénol
100 mM EDTA

BET (Bromure d'Ethidium):

En flacon de 25 ml avec 0,025 mg/ml

ANNEXE 7 : Enzymes utilisées pour la restriction enzymatique

Mae I / 822 213 / 50 units
 Lot.No: 84459522 - 23 / 29 Feb 2000
 VolAct. 2 units / μ l ; 0.025 ml
 Endo: >10 units
 5'Exo: < 0.1% ; 3'Exo: < 0.1%
 Lig: > 95% ; Rec: >95%
 FOR IN VITRO USE ONLY

BOEHRINGER MANNHEIM

For research purposes only. Not for use in diagnostic procedures for clinical purposes. FOR IN VITRO USE ONLY.

Restriction Endonuclease Mae I*

From *Methanococcus aeolicus* PL-15/H

Cat. No. 822 213 50 units

Cat. No. 822 221 250 units

↓
CTAG
GATC
↑

Product description

Specificity: Mae I recognizes the sequence C/TAG and generates fragments with 5'-cohesive termini (1). Mae I generates compatible ends to *Nde* I, *Mse* I, and *Asn* I.

Number of cleavage sites on different DNA's (2):

λ	Ad2	SV40	Φ X174	M13mp7	pBR322	pBR328
14**	54	12	3	4	5	4

Storage and dilution buffer: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 200 μ g/ml bovine serum albumin, 50% glycerol (v/v), pH ca. 8.0.

Supplied incubation buffer (2x conc.): 40 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 14 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0 (at 45°C).

Activity in SuRE/Cut 5 Buffer System***

A	B	L	M	H
25-50%	25-50%	0-10%	0-10%	10-25%

Volume activity: 1-5 x 10³ units/ml.

For lot-specific values see data label.

Unit definition: One unit is the enzyme activity that completely cleaves 1 μ g λ DNA in 1 h at 45°C in the incubation buffer in a total volume of 25 μ l.

Stability: The undiluted enzyme solution is stable when stored at -20°C.

Quality control

For lot-specific values see data label.

Absence of unspecific endonuclease activities: 1 μ g λ DNA is incubated for 16 h in 25 μ l incubation buffer with excess of Mae I. The number of enzyme units which do not change the enzyme-specific pattern is stated under "Endo".

Absence of 5'-exonuclease/5'-phosphatase activities: 5'-[³²P] terminally labeled λ x *Hpa* II fragments are incubated with Mae I for 4 h at 37°C in incubation buffer. After separation by TLC the release of radioactivity is calculated as a percentage value (detection limit: 0.1%) of liberated to input radioactivity per unit of Mae I (stated under "5'-Exo").

Absence of 3'-exonuclease activity: 3'-[³²P] terminally labeled λ x *Hpa* II fragments are incubated with Mae I for 4 h at 37°C in incubation buffer. After separation by TLC the release of radioactivity is calculated as a percentage value (detection limit: 0.1%) of liberated to input radioactivity per unit of Mae I (stated under "3'-Exo").

Ligation and recutting assay: Mae I fragments obtained by complete digestion of 1 μ g pBR322 DNA are ligated with 2 units T4-DNA ligase (Cat. No. 481 220) in a volume of 10 μ l by incubation for 16 h at 20°C in 66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithioerythritol, 1 mM ATP, pH 7.5 (at 20°C).

The percentage of ligation and subsequent recutting with Mae I which yields the typical pattern of pBR322 x Mae I fragments are determined and stated under "Lig" and "Rec".

References

- Schmid, K. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 2619.
- Kessler, C. & Manta, V. (1990) *Gene* 92, 1-248.

* Patents granted

** referred to λ cl 857 Sam 7

*** Cat. No. 1082 035

AluI



RRR NEB2 37° Yes

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	100	100	75	100

#137S 400 units
#137L 2,000 units

5'...AGCT...3'
3'...TCGA...5'

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *AluI* gene from *Arthrobacter luteus*.

Reaction Buffer: NEBuffer 2
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Reaction Buffer: NEBuffer 2
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 10-fold overdigestion with *AluI*, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Concentration: 8,000 units/ml.
Assayed on λ DNA.

Storage Conditions: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent B, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

AseI



RRR NEB3 37° Yes

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	NR	75	100	NR

#526S 2,000 units
#526L 10,000 units
order #526CL for high (5X) concentration

5'...ATTAAT...3'
3'...TAATTA...5'

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *AseI* gene from *Aquaspirillum serpense*

Reaction Buffer: NEBuffer 3
100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 10-fold overdigestion with *AseI*, 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Concentration: 10,000 and 50,000 units/ml.
Assayed on λ DNA.

Storage Conditions: 500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent B, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: Conditions of low ionic strength, high enzyme concentration, glycerol concentration >5%, or pH >8.0 may result in star activity (see page 261). *AseI* cleaves pBR322 and adenovirus-2 DNA at a rate 3 times that of λ DNA.

BsrI

NEB3 65° Yes

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	0	50	100	10

#527S 500 units
#527L 2,500 units

5'...ACTGGN...3'
3'...TGACCN...5'

Source: *Bacillus stearothermophilus* (NEB 447)

Reaction Buffer: NEBuffer 3
100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 65°C.

Ligation and Recutting: After 4-fold overdigestion with *BsrI*, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Concentration: 5,000 units/ml.
Assayed on φx174 DNA.

Storage Conditions: 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent B, see page 66.

Heat Inactivation: 80°C for 20 minutes.

Note: Incubation at 37°C results in 20% activity.

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

DdeI



RRR NEB3 37° Yes

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	75	100	100	75

#175S 500 units
#175L 2,500 units

5'...CTNAG...3'
3'...GANTC...5'

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *DdeI* gene from *Desulfovibrio desulfuricans*

Reaction Buffer: NEBuffer 3
100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 2-fold overdigestion with *DdeI*, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

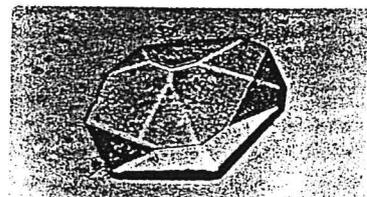
Concentration: 10,000 units/ml.
Assayed on λ DNA.

Storage Conditions: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent A, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: Cleaves single-stranded DNA slowly.



DdeI crystals (Lydia Dorner, Sandra Cook and Ira Schildkraut, New England Biolabs)

Cloned at NEBiolabs

Recombinant Enzyme

Optimum Buffer

Incubation Temperature

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	NR	NR	100	NR

Source: An *E. coli* strain that carries a *Dpn II* overproducing plasmid (S. Lacks)

Reaction Buffer: NEBuffer *Dpn II*
100 mM NaCl, 50 mM Bis Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 6.0 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 100-fold overdigestion with *Dpn II*, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Concentration: 10,000 and 50,000 units/ml. Assayed on λ DNA (*dam*⁻).

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	75	75	50	100

Source: *Deinococcus radiophilus* (ATCC 27603)

Reaction Buffer: NEBuffer 4
50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 20-fold overdigestion with *Dra I*, > 80% of the fragments can be ligated and recut.

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	75	100	75	75

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *Hinf I* gene from *Haemophilus influenzae* Rf

Reaction Buffer: NEBuffer 2
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 100-fold overdigestion with *Hinf I*, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	100	100	50	100

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *Mbo II* gene from *Moraxella bovis*

Reaction Buffer: NEBuffer 2
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 2-fold overdigestion with *Mbo II*, 50% of the DNA fragments can be ligated, and > 90% of these can be recut.

Concentration: 5,000 units/ml. Assayed on λ DNA (*dam*⁻).

RR NEB 37° dam Yes

Storage Conditions: 200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent B, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: *Dpn II* and *Sau3A I* are isoschizomers of *Mbo I*. Blocked by *dam* methylation (see page 269). Cleaves to leave a 5' GATC extension which can be efficiently ligated to DNA fragments generated by *BamH I*, *Bcl I*, *Bgl II*, *Mbo I*, *Sau3A I*, and *BstY I*. *Dpn II* exhibits star activity when incubated in a buffer with pH > 6.5.

Dpn II

#543S 1,000 units
#543L 5,000 units
order #543CS or CL for high (5X) concentration



NEB 37° Yes

Concentration: 20,000 units/ml. Assayed on λ DNA.

Storage Conditions: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent A, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: *Dra I* is an isoschizomer of *Aha III*.

Dra I



#129S 2,000 units
#129L 10,000 units



RR NEB 37° Yes

Concentration: 10,000 and 50,000 units/ml. Assayed on λ DNA.

Storage Conditions: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent A, see page 66.

Heat Inactivation: 80°C for 20 minutes.

Hinf I



#155S 5,000 units
#155L 25,000 units
order #155CS or CL for high (5X) concentration



RR NEB 37° dam Yes

Storage Conditions: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent A, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: Blocked by overlapping *dam* methylation (see page 269). Phenol extraction after cleavage and use of high concentration T4 DNA Ligase (NEB #202C, page 90) are recommended to achieve maximal ligation of *Mbo II* fragments. Digests of longer than one hour are not recommended.

Mbo II



#148S 250 units
#148L 1,250 units



NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	50	100	50	50

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *Ssp I* gene from *Sphaerotilus species* (NEB 958)

Reaction Buffer: NEBuffer *Ssp I*
50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100 (pH 7.5 @ 25°C). Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 10-fold overdigestion with *Ssp I*, >95% of the DNA fragments can be ligated and recut.

Concentration: 5,000 and 25,000 units/ml.
Assayed on λ DNA.

RR NEBU 37° Yes



Ssp I

Storage Conditions: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent A, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: Conditions of low ionic strength, high enzyme concentration, glycerol concentration >5%, or pH >8.0 may result in star activity (see page 261).

#132S 1,000 units
#132L 5,000 units

order #132CL for high (5X) concentration

5'... AATATT... 3'
3'... TTAATA... 5'

NEBuffer	1	2	3	4
% Activity	100	100	75	100

Source: An *E. coli* strain that carries the cloned *Xmn I* gene from *Xanthomonas manihotis* 7AS1

Reaction Buffer: NEBuffer 2 + BSA
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Supplement with 100 µg/ml BSA. Incubate at 37°C.

Ligation and Recutting: After 25-fold overdigestion with *Xmn I*, >95% of the DNA fragments can be ligated and then recut.

Concentration: 20,000 units/ml.
Assayed on λ DNA.

RR NEB2 BSA 37° Yes



Xmn I

Storage Conditions: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA, and 50% glycerol. Store at -20°C.

Diluent Compatibility: Diluent A, see page 66.

Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.

Note: *EcoR I* sites which have been cleaved, filled in by DNA polymerase and blunt-end ligated, generate *Xmn I* recognition sites: GAATTAATTC. Conditions of low ionic strength, high enzyme concentration, glycerol concentration >5%, or pH >8.0 may result in star activity (see page 261).

#194S 1,000 units
#194L 5,000 units

5'... GAANNNTTC... 3'
3'... CTTNNNAAG... 5'

ANNEXE 8 : Kit de purification des produits PCR en vue du séquençage

ENZYMATIC PRE-SEQUENCING TREATMENT OF PCR PRODUCTS

1. PCR amplification mixture	5 μ l
Exonuclease I (10.0U/ μ l)	1 μ l
Shrimp Alkaline Phosphatase (2.0U/ μ l)	1 μ l
Total	7 μ l

Mix and incubate at 37°C 15 minutes. (It is convenient to do this in a thermal cycler.) Note: When treating more than 10 μ l of PCR product, increase the amount of exonuclease and phosphatase proportionally.

2. Inactivate Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase by heating to 80°C for 15 minutes. (It is also convenient to do this in a thermal cycler.)

The DNA is now ready for direct sequencing with Sequenase** Version 2.0 or Thermo Sequenase^{TM††} DNA polymerase using the protocols supplied with the individual sequencing kit. The following sequencing kits are recommended for use in sequencing PCR products.

Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (US70770)

Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (US78500)

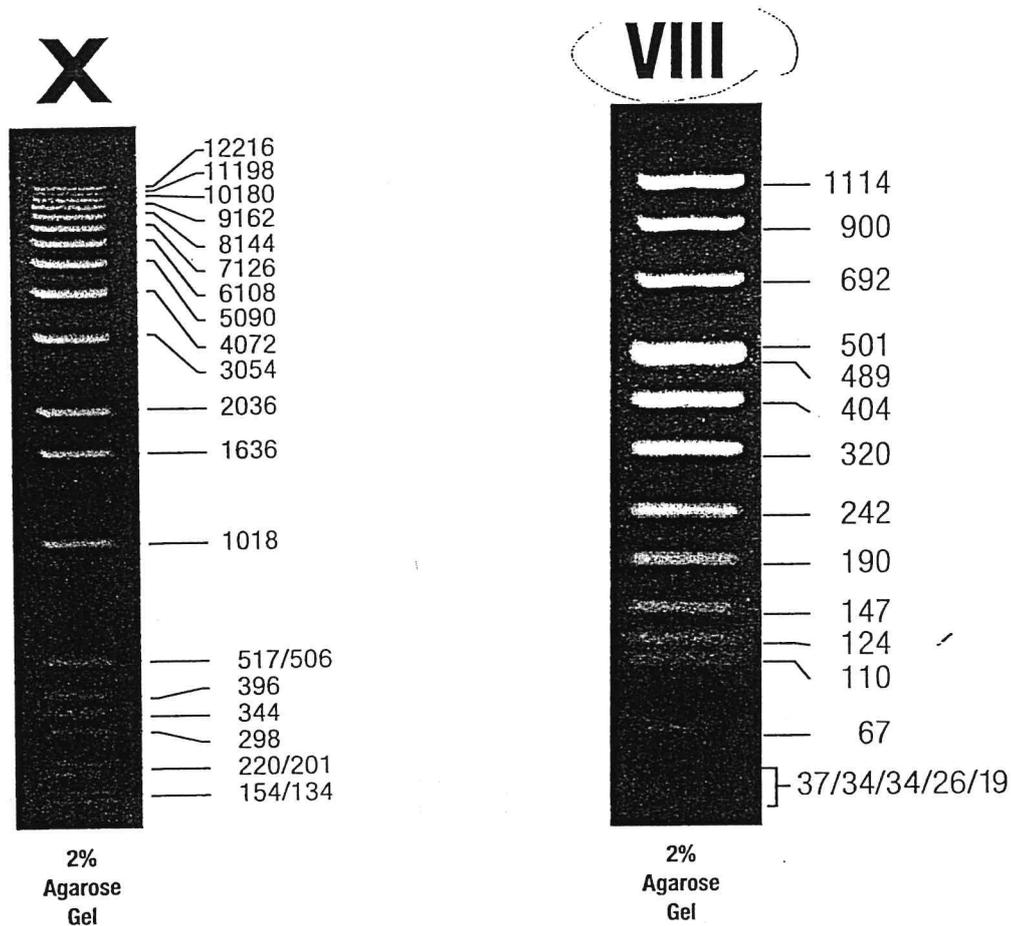
Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (In the US, order 188403 directly from USB Corporation. Outside the US order US79750 and AH9539 from Amersham Pharmacia Biotech.)

Note: When sequencing the treated PCR product with USB's Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (US70770) the following primer annealing protocol should be used:

Annealing primer and template	
Treated PCR product	___ μ l (up to 9 μ l)
Primer (5-10pmol/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	___ μ l (to adjust volume to 10 μ l)
Total	10 μ l

Incubate 2-3 minutes at 100°C, preferably in a thermal cycler. Cool as quickly as possible by placing the vial directly in an ice/water bath for 5 minutes. Keep the tube on ice prior to sequencing.

ANNEXE 9 : Marqueurs de poids moléculaire utilisés en électrophorèse



Description: The 100 bp DNA Ladder has a number of proprietary plasmids that are digested to completion with appropriate restriction enzymes to yield 12 fragments suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. The digested DNA includes fragments ranging from 100–1500 base pairs. The 500 and 1,000 base pair fragments have increased intensity to serve as reference points.

Preparation: Double-stranded DNA is digested to completion with the appropriate restriction enzymes, phenol extracted and equilibrated to 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA.

Concentration and Shipping: 500 µg/ml. Supplied in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA. For long term storage store at –20°C. Both DNA Ladders are stable for at least 3 months at 4°C.

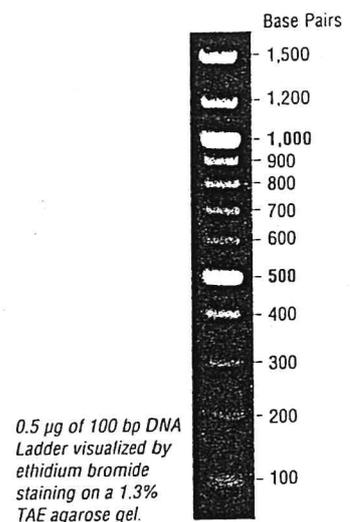
Note: All fragments have 4-base, 5' overhangs that can be end labeled using T4 Polynucleotide Kinase (NEB #201) or filled-in using DNA Polymerase I, Klenow Fragment (NEB #210) (1). Use α -[³²P] dATP or α -[³²P] dTTP for the fill-in reaction.

Usage Recommendation:
We recommend loading 0.5 µg of 100 bp DNA Ladder diluted in sample buffer.

Reference:
(1) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, 10.51–10.67.

100 bp DNA Ladder

#323-1S 50 µg
#323-1L 250 µg



0.5 µg of 100 bp DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 1.3% TAE agarose gel.

ANNEXE 10 : Provenance des différents réactifs utilisés en PCR

product	reference	supplier
Taq polymerase and buffer 10X	201205	Qiagen SA 3 avenue du Canada LP 809 91974 Courtaboeuf cedex tel: 0160920920 fax/0160920925
d ATP 100mM	1 051 440	Boehringer 2 avenue Vercors BP 59 38242 Meylan cedex tel: 04763034 fax:0476764630
d TTP 100mM	1 051 482	
d GTP 100mM	1 051 466	
d CTP 100mM	1 051 458	
primer		Genset (SA) e-mail = oligo@genset.fr tel: 33143565900 fax:33143565948
seakem GTG agarose	50071	Tebu 39 rue de Houdan 78610 de Perray en Yvelines tel: 0130463900, 0130463911
Seaplaque GTG agarose	50110	
Microamp caps	N 801-0535	Perkin Elmer 25 avenue de la Baltique 91943 Courtaboeuf cedex BP 96 Tel: 0169598484 Fax:0169598400
Microamp tubes	N 801-0580	
ASNI	1 097 008	Boehringer
Dra I	129 S	Ozyme 10 avenue Ampère 78053 St Quentin Yvline cedex tel: 0134601516 fax:0134609212
DPN II	543 S	
100bp DNA ladder	323- 1	
Pipette tips with filter Isotip COSTAR 1-30µl	004821	Dutscher S.A 11 rue Christine de Sarce BP 62 F 67172 Brumath cedex Tel: 03 88 59 33 90 Fax 03088 59 33 99
Ethidium Bromide	E 406	Interbiotech interchim 213 av J. F. KennedBP 1140 03100 Montlujon cedex
BM DNA MWM X	1498037	Boehringer

Loading buffer: sucrose 60 %, 100mM EDTA pH = 8, 0.25% Bromophenol Blue

TAE 50 X is constituted as:

242g	-	Tris base
57.1 ml	-	glacial acetic acid
100ml	-	EDTA 0.5M
H ₂ O	qsp	- 1000ml

Liste des figures

Figure 1 : Répartition géographique probable de la PPCB en Afrique, pays ayant déclaré la maladie en 1999 et origine des souches de <i>MmmSC</i> étudiées	11
Figure 2 : Répartition actuelle probable de la PPCC, pays où <i>Mccp</i> a été isolé et origine des souches de <i>Mccp</i> étudiées	12
Figure 3 : Variation dans l'expression des antigènes de surface de populations clonales de mycoplasmes révélée par des colorations immunochimiques avec différents anticorps monoclonaux spécifiques.	18
Figure 4 : Exemples de coupures et de sites de reconnaissance par des enzymes de restriction	21
Figure 5 : Représentation schématique du principe de la différenciation par restriction enzymatique	22
Figure 6 : Modèle de typage de <i>MmmSC</i> par les séquences d'insertion	25
Figure 7 : Principe de l'amplification d'un ADN double brin par PCR.....	27
Figure 8 : Principe de la différenciation de T1/44 par PCR semi-aléatoire	28
Figure 9 : Structure des di-désoxynucléotides utilisés dans la technique de Sanger	32
Figure 10 : Détermination de la séquence d'un acide nucléique par la méthode de Sanger (di-désoxynucléotides)	33
Figure 11 : Arbre phylogénétique basé sur des mutations sur le gène de l'ARN 16S de souches de <i>Mccp</i>	34
Figure 12 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ARN 16S des opérons <i>rrnA</i> et <i>rrnB</i>	35
Figure 13 : Arbre phylogénétique de souches du "groupe Mycoides" basé sur une séquence intergénique de 320 pb entre l'ORF ₂ et <i>fba</i>	36
Figure 14 : Représentation schématique des loci du gène <i>lppA</i>	37
Figure 15 : Principe de l'amplification par PCR d'un fragment d'ADN d'environ 2,2 kb supposé variable entre les souches de <i>MmmSC</i>	42
Figure 16 : Principe de l'amplification par PCR de deux fragments d'ADN supposés variables entre les souches de <i>Mccp</i>	43
Figure 17 : Résultats de l'amplification par la Taq polymérase Qiagen de l'ADN de 3 souches de <i>Mccp</i> avec le couple d'amorces <i>LppAF/LppAR</i> , en utilisant deux programmes différents.....	49
Figure 18 : Résultats de l'amplification par l'Expand™ Long Template de l'ADN de 3 souches de <i>MmmSC</i> avec l'amorce <i>MmmSCA</i> et de l'ADN de 3 souches de <i>Mccp</i> avec le couple d'amorces <i>LppAF/MTLDR</i>	50
Figure 19 : Résultats de la ré-amplification des fragments d'ADN a, b et c avec les amorces correspondantes	51
Figure 20 : Résultat de la digestion par <i>Dpn II</i> des 3 fragments d'ADN issus de la ré-amplification : les fragments a, b et c.....	52

Figure 21 : Résultats de la digestion par <i>Mbo</i> II des fragments a et c	53
Figure 22 : Résultats de digestion par <i>Ase</i> I des fragments a et c	54
Figure 23 : Résultats de digestion par <i>Dra</i> I des fragments a et c.....	55
Figure 24 : Résultats de digestion par <i>Ssp</i> I des fragments a et c	56
Figure 25 : Résultats de digestion par <i>Dde</i> I des fragments a et c	57
Figure 26 : Résultats de digestion par <i>Bsr</i> I des fragments a et c	58
Figure 27 : Résultats de digestion par <i>Alu</i> I, <i>Hinf</i> I et <i>Xmn</i> I des fragments a et c	59
Figure 28 : Résultats de la digestion par <i>Hinf</i> I du fragment a.....	60
Figure 29 : Résultats de la digestion par <i>Hinf</i> I du fragment a.....	61
Figure 30 : Résultats de digestion par <i>Mae</i> I des fragments a et c.....	62
Figure 31 : Alignement des séquences du fragment b pour les souches F38 et Gabes de <i>MmmSC</i>	64
Figure 32 : Représentation schématique de la différenciation de 87-137-10 par restriction enzymatique avec <i>Hinf</i> I.....	67

Liste des tableaux

Tableau I : Espèces de mycoplasmes pouvant être rencontrées chez les caprins	14
Tableau II : Classification des souches de <i>MmmSC</i> selon des profils de restriction enzymatique obtenus après digestion simultanée par <i>Hind</i> III et <i>Xba</i> I.....	23
Tableau III : Mélange réactionnel avec la <i>Taq</i> Polymérase Qiagen	44
Tableau IV : Mélange réactionnel avec l' <i>Expand</i> TM Long Template.....	44
Tableau V : Mélanges réactionnels pour la digestion enzymatique.....	47