

APPLICATION DE LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR LA POLYMERASE (PCR) A L'IDENTIFICATION DE *MYCOPLASMA IOWAE*

KEMPF Isabelle¹, GRAU Odile², GESBERT Fabienne¹, MOALIC P.Y.¹, GUITTET Michèle¹ et BENNEJEAN G.¹

¹ CNEVA-LCRAP, Unité de Pathologie aviaire, 22440 Ploufragan

² Institut Pasteur, Oncologie virale, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris

Résumé

En l'absence de techniques sérologiques utilisables pour le dépistage des infections à *Mycoplasma iowae* (MI), le diagnostic repose sur l'isolement et l'identification du germe. Du fait des difficultés et des délais inhérents à la culture des mycoplasmes, la mise au point d'une méthode rapide d'identification de MI est nécessaire. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la technique d'amplification en chaîne par la polymérase (ACP = PCR). Différents couples d'amorces ont été sélectionnés et évalués lors d'essais d'amplification de l'ADN de MI et d'autres mollicutes. La spécificité et la sensibilité des réactions de PCR réalisées avec ces différentes amorces sont présentées.

Abstract

Development of PCR-based assays for *Mycoplasma iowae*

Different sets of oligonucleotide primers have been designed from published sequences of *Mycoplasma iowae* and used for polymerase chain reaction assays. Specificity and sensitivity of amplifications obtained with these primers are described and compared with results recently published by other teams.

Introduction

Mycoplasma iowae (MI) est responsable de chutes d'éclosabilité chez la dinde reproductrice. Inoculé au dindonneau il peut entraîner des aérosacculites ou des lésions des pattes, mais les connaissances relatives à son pouvoir pathogène naturel, seul ou en association avec d'autres agents bactériens ou mycoplasmatiques, restent limitées (Kleven, 1991). Les efforts consentis par certaines organisations avicoles ont permis de diminuer le niveau d'infections à MI dans les troupeaux de dindes reproductrices. Cependant il convient de rester vigilant vis-à-vis de ce mycoplasme, d'autant que MI se montre particulièrement résistant vis-à-vis de différents antibiotiques et peut être hébergé par plusieurs espèces aviaires, domestiques ou sauvages. En l'absence de techniques sérologiques applicables pour ce mycoplasme, le dépistage repose sur sa mise en évidence, soit par mise en culture puis identification, soit par détection de son génome ou de gènes spécifiques. Basée sur ce principe, la méthode de PCR (amplification en chaîne par la polymérase) peut être appliquée à MI. Nous exposons ici les travaux réalisés au CNEVA-Ploufragan et les comparons aux résultats très récemment publiés par d'autres équipes.

Matériel et Méthodes

Les souches mycoplasmatiques utilisées comprennent six souches de référence de *Mycoplasma iowae* (I695, J, K, N, Q et R), douze souches de MI "terrain" isolées en France (84355, 340, 84364, 7202, 90161 à 90166, 90168 et PPAV), six souches de MI isolées en Israël et fournies par le Dr S. Levisohn, trois souches de MI isolées au Royaume Uni et fournies par le Dr J.M. Bradbury ainsi que les souches *M. gallisepticum* ATCC 15302, A5969 et 83218, *M. synoviae* WVU 1853, 354 et 86122, *M. gallinarum* ATCC 19708, *M. iners* ATCC 15969, *M. meleagridis* ATCC 25294 et *Acholeplasma laidlawii* PG8 (Kempf et al 1994).

L'ADN des souches de MI, *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. synoviae* WVU 1853 et *A. laidlawii* PG8 est préparé selon la technique de Razin et al (1983). Pour les autres souches utilisées, des lysats cellulaires sont préparés par congélation-décongélation selon la méthode décrite par Bej et al (1991). Par ailleurs, des préparations d'ADN de i) *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *Escherichia coli*, ii) *Spiroplasma citri*, iii) *M. pneumoniae*, *Bacillus subtilis* et iv) de poulet sont fournies respectivement par les Dr Abiven (CNEVA-Ploufragan), Bové (INRA-Bordeaux), Bébéar (CHU-Bordeaux) et Le Pennec (Université Rennes I).

L'alignement des séquences des gènes d'ARN ribosomiques (ARNr) 16S de MI souche I695 et de différentes autres espèces de mollicutes (Weisburg et al 1989, Grau et al, 1991) a été réalisé. Deux couples d'amorces ont été sélectionnés pour l'amplification génétique (PCR) d'une portion de génome de MI. Les séquences sont les suivantes :

RNA3 : 5'-ACGAGCTGACGACAACCATGCAC-3'
RNAIo : 5'-TTGTTATCGCATGAGAGAATG-3'
RNAI2 : 5'-CTAATACCGCATAGGACATTG-3'
RNAI1 : 5'-GATACCGTCACACAGAAAGC3'

D'autre part le cadre ouvert de lecture (ORF) situé en amont de l'opéron ribosomique de MI (Grau, 1991) a permis de sélectionner un troisième couple d'amorces :

MIOG1 : 5'-TATGTTTACAATCTGGTAGTGATGATG-3'
MIOG2 : 5'-ATCAATTATTTACCAACTAAAGAGTCA-3'

Les couples d'amorces RNAIo-RNA3, RNAI2-RNAI1 et MIOG1-MIOG2 dirigent l'amplification de fragments d'ADN de 892, 332 et 527 paires de bases (pb) respectivement.

Pour les deux premiers couples d'amorces, les amplifications sont effectuées dans les conditions de tampon, température, durée et nombre de cycles précédemment décrites (Kempf et al 1994). Pour le couple MIOG1-MIOG2, les conditions d'amplification optimisées sont identiques à celles du couple RNAIo-RNA3, mais effectuées en l'absence de chlorure de tétraméthyl ammonium. L'analyse des produits d'amplification est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 ou 2%, coloration au bromure d'éthidium et observation sous ultraviolets. Des marqueurs de masse moléculaire permettent de contrôler la taille des fragments amplifiés.

Résultats

Avec les amorces RNA3 et RNAIo, des produits d'amplification (taille environ 900 pb) sont observés avec l'ADN des 18 souches de MI testées (six souches de référence et douze souches terrain françaises) ainsi qu'avec l'ADN de *S. citri*. Des produits d'amplification de tailles différentes sont observables avec l'ADN de *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *A. laidlawii* et *B. subtilis*. Aucune bande n'est observée sur gel à partir des autres ADN.

L'amplification avec les amorces RNAI1 et RNAI2 conduit à l'obtention d'un produit d'environ 300 pb à partir de l'ADN des mêmes 18 souches de MI testées. Cependant des produits non spécifiques (de tailles différentes) sont observés avec l'ADN de *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *S. citri*, *A. laidlawii*, *B. subtilis* et *E. coli*.

Avec les amorces MIOG1 et MIOG2, dans les conditions retenues, les ADN des souches de référence de *M. iowae* I, J, K, N et Q et de 20 des 21 souches de MI terrain françaises ou étrangères donnent des produits d'amplification de 527 pb. La souche de référence MI R et une souche MI israélienne paraissent négatives. Tous les autres ADN sont négatifs. De plus, les lysats cellulaires préparés à partir de souches de *M. gallisepticum* A5969 et 83218, *M. synoviae* 354 et 86122, *M. meleagridis*, *M. iners* et *M. gallinarum* sont négatifs.

Discussion et conclusion

La mise au point d'un test PCR applicable à MI se heurte au problème de la variabilité intraspécifique de ce mycoplasme (Levisohn et al, 1994). Il est donc indispensable de contrôler que les amorces et les conditions d'amplification retenues permettent d'amplifier la totalité des souches de référence et de nombreuses souches terrain. Deux des couples d'amorces que nous avons testés (RNA3-RNA10 et RNA11-RNA12) ont été sélectionnés dans les séquences des gènes d'ARNr 16S. Ils amplifient l'ensemble des souches de MI analysées mais des amplifications non spécifiques sont également observées avec d'autres mollicutes dont *M. gallisepticum*, un autre agent pathogène des volailles. Une solution pour augmenter la spécificité du test serait d'analyser les profils de restriction des produits amplifiés ou d'utiliser une sonde interne permettant de différencier MI des autres espèces mycoplasmaïques. Ainsi, l'approche retenue par Garcia et al (1994) consiste à amplifier un fragment de 780 pb du gène d'ARNr 16S, à partir d'amorces communes à *M. gallisepticum*, *M. synoviae* et MI. Les amplicons sont ensuite différenciés après restriction ou hybridation à l'aide d'une sonde oligonucléotidique.

Les amorces MIOG1 et MIOG2 sélectionnées dans l'ORF situé en amont de l'opéron ribosomique de MI sont plus spécifiques, mais deux souches de MI ne sont pas amplifiées sur les 27 testées. Très récemment, Deaville et al (1994) ont montré l'intérêt d'amorces situées dans cette région, capables d'amplifier spécifiquement l'ADN de toutes les souches de référence de MI. L'amplification de lysats cellulaires se révèle, selon ces auteurs, également possible à condition d'utiliser non pas la Taq polymérase mais la Tth polymérase.

Enfin Zhao et Yamamoto (1993) utilisent des amorces situées au niveau de séquences de plasmides clonés au hasard. Cependant la température d'hybridation des amorces lors de l'amplification se révèle particulièrement critique.

Il semble donc que les amorces déterminées à partir de séquences situées en amont de l'opéron ribosomique de MI soient plus adaptées pour la détection de ce mycoplasme. Les gènes ribosomiques sont en effet plus conservés entre les espèces et, en conséquence, les amorces choisies peuvent être moins spécifiques. L'ORF situé en amont de l'opéron ribosomique est une région plus variable, et donc moins susceptible d'être amplifié chez d'autres espèces. Il est cependant nécessaire de tester plusieurs couples d'amorces situés dans cette région et de vérifier qu'elles amplifient bien toutes les souches de MI.

Les résultats présentés ici montrent la difficulté de mettre au point un test parfaitement spécifique pour *M. iowae* du fait de la variabilité intraspécifique de ce mollicute. Des travaux sont maintenant réalisés afin d'analyser de nouveaux couples d'amorces et permettront d'évaluer leur intérêt dans les conditions "terrain".

Références

- Bej A.K., Mahbubani M.H., Dicesare J.L. and Atlas R.M. 1991, *Applied and Environn. Microbiol.* 57, 3529-3534.
Deaville J., Bradbury J.M., Bove J.M., and Laigret F. 1994. *IOM Letters*, 3, 435-436.
Garcia M., Jackwood M.W., Kleven S.H., Levisohn S. and Johansson K.E., 1994. *IOM Letters*, 3, 480
Grau O. 1991, Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux II.
Grau O., Laigret F., Carle P., Tully J.G., Rose D.L. and Bové J.M. 1991. *Int. J. Sys. Bact.* 41, 473-478.
Kempf I., Blanchard A., Gesbert F., Guittet M. and Bennejean G., 1994. *Res. Vet. Sci.*, 56, 179-185.
Kleven S.H., 1991. in : *Diseases of Poultry* (B. Calnek and coll edit.) Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp231-233.
Levisohn S., Eliasian E., Fan H. and Kleven S.H. 1994. *IOM Letters*, 3, 437-438.
Razin S., Tully J.G., Rose D.L. and Barile M.F. 1983. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1935-1944.
Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L. et al, 1989. *J. Bacteriol.* 171, 6455-6467.
Zhao S. and Yamamoto R., 1993. *Avian Dis.* 37, 212-217