ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE SOUCHES PATHOGENES *DE MYCOPLASMA PULLORUM.*

Moalic Pierre-Yves[1], Kempf Isabelle[1], Gesbert Fabienne[1] et Laigret Frédéric[2].

[1]CNEVA-PLOUFRAGAN. U.R. Mycoplasmologie-Bactériologie. B.P. 53. ZOOPOLE. 22440 PLOUFRAGAN.
[2]INRA. Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire. 33883 VILLENAVE D'ORNON Cedex.

Résumé

Deux souches de mycoplasme ont été isolées sur le terrain d'embryons de dindonneaux morts. L'étude des caractères biochimiques et sérologiques a montré que ces isolats étaient proches de *Mycoplasma pullorum*, un mycoplasme jusqu'à présent limité à l'espèce poule et non pathogène pour cette espèce. Afin de mieux caractériser ces deux souches et de situer *M. pullorum* dans la phylogénie, la détermination et l'analyse des séquences des gènes d'ARN 16S des souches du terrain et de la souche de référence ont été réalisées. Les résultats confirment l'appartenance des deux isolats à l'espèce *M. pullorum*. Le pouvoir pathogène de ces deux isolats a été étudié après inoculation à l'oeuf embryonné de poule.

Abstract

Identification of two pathogenic avian mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*.

Two mycoplasma strains were isolated from dead turkey embryos free of other known pathogens. They were not related to *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* and *M. iowae*, known to be pathogenic for turkeys. Because biochemical and serological properties showed that these strains were related to *M. pullorum*, a non pathogenic avian mycoplasma, we decided to evaluate the pathogenic properties of these strains and determine the phylogenetic position of *M. pullorum* and the two field isolates.

Introduction

Mycoplasma gallisepticum (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) et *M. iowae* (MI) sont les mycoplasmes pathogènes majeurs des volailles. D'autres mycoplasmes peuvent également être isolés à partir des volailles mais ne sont pas considérés comme pathogènes (*M. cloacale*, *M. gallinarum*, *M. gallopavonis*, *M. iners* ou *M. lipofaciens*...) (Jordan, 1989). Nous avons récemment isolé deux souches de mycoplasmes à partir d'embryons de dinde morts en l'absence d'autre agent pathogène.

Après étude des caractères biochimiques et sérologiques, ces isolats semblaient apparentés à *Mycoplasma pullorum*, un mycoplasme non pathogène, isolé habituellement à partir de poulet.

Pour vérifier leur appartenance à l'espèce *M. pullorum* et pour établir la position phylogénétique de *M. pullorum* nous avons décidé de séquencer les gènes d'ARN16S de ces deux isolats.

Le pouvoir pathogène de trois souches de *M. pullorum* (1 souche de référence et deux souches isolées du terrain) a également été étudié sur des oeufs embryonnés de poule.

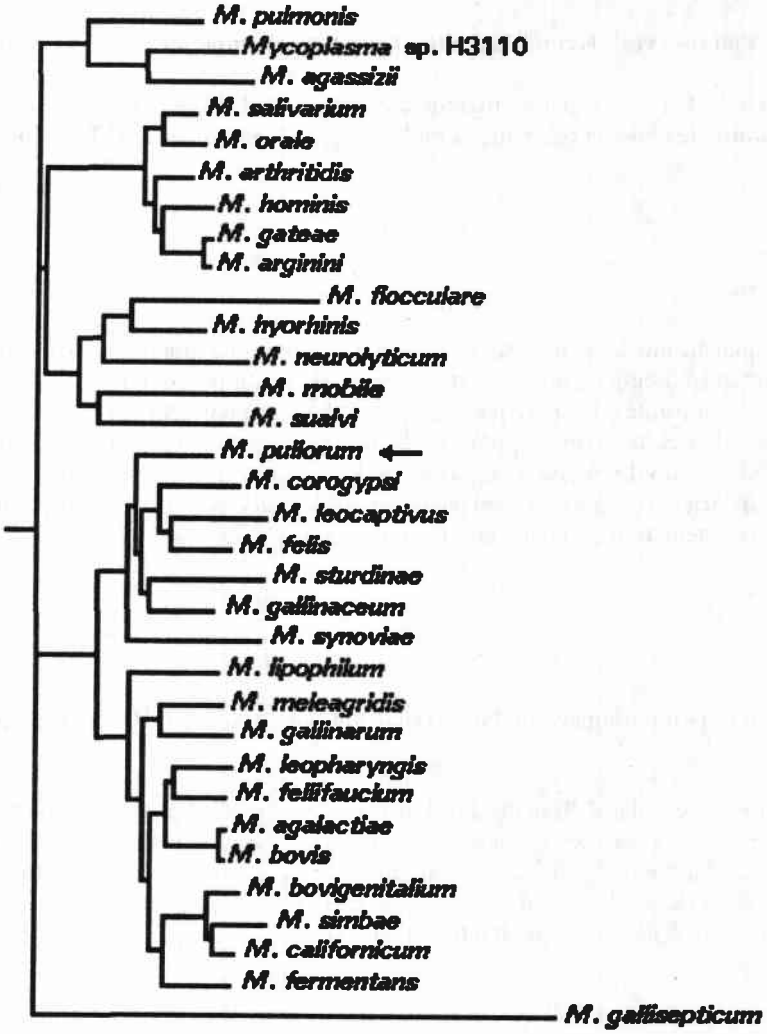
Matériel et méthodes

Les souches *M. anatis* 1340^T (ATCC 25524), *M. columbinum* MMP-1 (ATCC 29257), *M. gallinaceum* DD (ATCC 33350), *M. gallinarum* PG16 (ATCC 19708), *M. gallopavonis* WR1 (ATCC 33551), *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. glycophilum* 486 (ATCC 35277), *M. iowae* 695 (ATCC 33552), *M. pullorum* CKK (ATCC 33553), *M. synoviae* WVU 1853 (ATCC 25204) et *M. meleagridis* 17529 (ATCC 25294) ont été utilisées.

La souche 94254 a été isolée à partir de dindonneaux morts issus d'un lot de dindes exemptes de MG, MS, MI et MM. La souche 95098GC a été isolée d'un autre troupeau à partir d'embryons de dindes morts. Ces souches ont été isolées à partir du vitellus des embryons mis en culture sur milieu FM4 (Frey et al., 1968). Chaque souche a été clonée trois fois avant analyse (Comité International de Systématique Bactérienne, 1995).

Des tests biochimiques (fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine, sensibilité à la digitonine,

FIGURE 1 : Arbre phylogénétique du groupe de *M. hominis*.



réduction des sels de tétrazolium, activité phosphatase, production de films et spots et croissance en l'absence de NAD et de L-cystéine) et sérologiques (dot-immunobinding, test d'inhibition de croissance, test d'inhibition du métabolisme) ont été réalisés selon des procédures précédemment décrites (Nougareyde, 1985, Clyde, 1983, Poumarat et al., 1991).

Une amplification enzymatique des gènes d'ARN 16S de *M. pullorum* CKK, 94254 et 95098GC a été réalisée avec les amorces de Weisburg (Weisburg et al., 1991), spécifiques des gènes d'ARN 16S de la plupart des eubactéries. La réaction PCR est réalisée selon des conditions déjà décrites (Moalic et al., 1997).
Après clonage dans le vecteur PGEM-T (Promega, Madison, WI, USA), les produits amplifiés ont été séquencés selon la méthode de Lane et al. en utilisant des amorces universelles «forward» et «reverse» ainsi que des amorces universelles internes au gène d'ARN 16S (Lane et al., 1985).
Les séquences obtenues ont ensuite été comparées à celles disponibles dans les banques de données de biologie moléculaire Genbank et EMBL en utilisant les logiciels «Blast» (Altshul et al., 1990) et «Fasta» (Wilbur et al., 1983). Les séquences les plus proches ont ensuite été alignées à l'aide du logiciel «Pileup» (Devereux et al., 1984). Une séquence de 1331 nucléotides équivalente à la séquence du gène d'ARN 16S de *M. pullorum* a ainsi été déterminée.
M. pullorum a ensuite été placé dans l'arbre phylogénétique.

Les études de pouvoir pathogène ont été réalisées sur des oeufs embryonnés de poule âgés de 7 jours, inoculés avec 0,1 ml de culture de mycoplasme dans le sac vitellin. Pour chacune des souches testées, *M. pullorum* CKK, 94254 et 95098GC, trois dilutions (10, 10^3, 10^5 unités changeant couleur (UCC)) ont été inoculées à 20 oeufs. Les oeufs ont été mirés jusqu'au $13^{ème}$ jour d'incubation. La mortalité a été enregistrée. Tous les embryons ont été autopsiés et les lésions ont été notées. Le vitellus a été mis en culture pour recherche de mycoplasmes.

Résultats

Les résultats des analyses biochimiques sont données dans le tableau 1.
Les propriétés biochimiques des souches 94254 et 95098GC sont identiques à celles de *M. pullorum* et *M. gallinaceum*.

TABLEAU 1 : Caractères biochimiques des souches *M. pullorum* ATCC, 94254 et 95098GC.

Propriétés biochimiques	*M. pullorum* CKK	94254	95098
fermentation du glucose	+	+	+
hydrolyse de l'arginine	-	-	-
Besoin en NAD-Cystéine	-	-	-
1,5% digitonine	sensible	sensible	sensible
Activité phosphatase	-	-	-
Réduction du chlorure de tétrazolium	-	-	-
Formation de films et spots	-	-	-

Une réaction positive a été obtenue pour le test de dot-immunobinding réalisé sur les souches 94254 et 95098GC avec le sérum anti-*M. pullorum*. L'inhibition de la croissance des souches 94254 et 95098GC a été obtenue avec un sérum anti-*M. pullorum*.

Les résultats des analyses phylogénétiques ont montré que les séquences des gènes d'ARN 16S des deux isolats du terrain et de *M. pullorum* CKK étaient identiques. Les séquences obtenues ont été déposées dans la banque de données Genbank sous le numéro d'accession U58504.

La comparaison de la séquence du gène d'ARN 16S de *M. pullorum* avec celles d'autres mycoplasmes présentes dans les banques de données a permis la réalisation d'un arbre phylogénétique (Fig. 1).
L'espèce *M. pullorum* appartient au groupe *de M. hominis* selon les critères définis par Weisburg et al..

Les études du pouvoir pathogène ont montré que la mortalité des oeufs embryonnés non inoculés ou inoculés avec du milieu stérile était inférieure à 15% alors que les embryons inoculés avec les souches 94254, 95098GC et CKK ont montré entre 30 et 65% de mortalité selon la souche et la concentration de l'inoculum. Les résultats sont présentés sur les figures 2, 3 et 4.

FIGURES 2, 3, 4 : Evolution de la mortalité embryonnaire en fonction de la souche inoculée et du titre de l'inoculum. Figure 1 : *M. pullorum* CKK. Fig. 2 : souche 94254. Fig. 3 : souche 95098GC. Triangles. 10 UCC/ml. ronds. 10^3 UCC/ml. carrés. 10^5 UCC/ml.

FIGURE 2

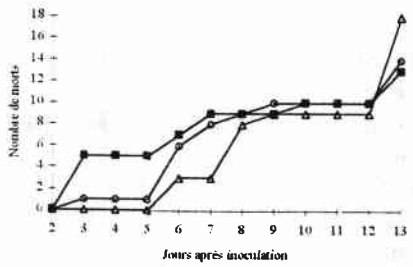


FIGURE 3

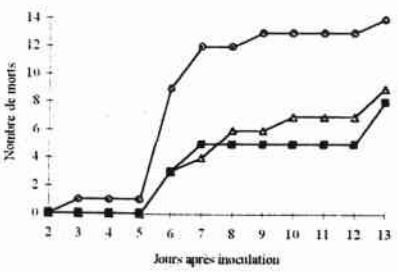
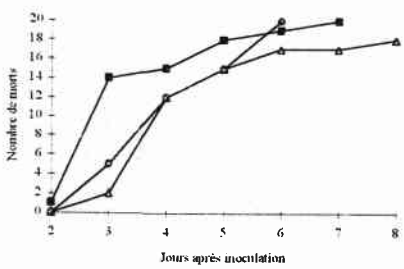


FIGURE 4



Conclusion

Cette étude démontre donc clairement l'appartenance des deux souches isolées d'embryons de dindes morts en l'absence d'autre agent pathogène connu à l'espèce *M. pullorum*.
La mortalité des oeufs embryonnés de poule inoculés avec ces 2 isolats semble significative mais moins importante toutefois que d'autres mycoplasmes reconnus responsables de mortalités embryonnaires comme MI.
Pourtant, selon certains auteurs, *M. pullorum* ne semblait pas, jusqu'à présent, une espèce habituelle de la dinde et son pouvoir pathogène paraissait limité (Dierk et al., 1967) (Kleckner, 1960) (Yoder et al., 1964).

Des études complémentaires devront donc être engagées afin de mieux apprécier l'importance du pouvoir pathogène de *M. pullorum* sur l'espèce poule et l'espèce dinde d'autant que, sur le terrain, d'autres souches présentant les mêmes caractères biochimiques et antigéniques ont récemment été isolées à partir de divers troupeaux de dindes reproductrices ou d'embryons de dindonneaux morts (Kempf et al., 1996).

Références bibliographiques

Altshul S. F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. J. Mol. Biol., 215, 403-410.
Clyde W. A., 1983. In S. Razin and J. G. Tully (eds.). Methods in Mycoplasmology, Vol. 1. Academic Press Inc., New York, pp 405-410.
Devereux J., Haeberli P., Smithies O., 1984. Nucleic Acids Res., 12, 387-395.
Frey M. L., Hanson R. P., Anderson D. P., 1968. AM. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. 1995. Int. J. Syst. Bacteriol., 45,605-612.
Kempf I., Gesbert F., Moalic P.Y., Guittet M., Bennejean G., 1996. Bull. Acad. Vét. de France, 69, 197-203.
Lane D. J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R., 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6955-6959.
Moalic P.Y., Kempf I., Gesbert F., Laigret F., 1997. Int. J. Syst. Bact., sous presse.
Nougayrede P., Gaillard-Perrin G., Andral B., 1985. Le Point Vétérinaire, 17, 127-140.
Poumarat F., Perrin B, Longchambon D, 1991. Vet. Microbiol., 29, 329-338.
Weisburg W. G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 1991. J. Bacteriol., 173, 697-703.
Wilbur W. J., Lipman D.J., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 726-730.