



HAL
open science

Polymorphisme génomique chez *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

Aboubakar Yaya

► **To cite this version:**

Aboubakar Yaya. Polymorphisme génomique chez *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Médecine vétérinaire et santé animale. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2008. Français. ⟨NNT : 2008INPT028A⟩. ⟨tel-04425902⟩

HAL Id: tel-04425902

<https://hal.science/tel-04425902v1>

Submitted on 30 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par : l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Spécialité : Sciences vétérinaires

Présentée et soutenue par YAYA Aboubakar

Le 05 novembre 2008

Polymorphisme génomique chez *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC : applications à l'épidémiologie moléculaire et validation d'un modèle d'inoculation sous-cutanée pour l'étude de la virulence des souches.

Jury :

M. Philippe DORCHIES, Président

Mme Dominique Le GRAND, Rapporteur

M. Serge MORAND, Rapporteur

M. Pascal SIRAND-PUGNET, Membre

M. Xavier BERTHELOT, Directeur de thèse

M. François THIAUCOURT, Co-directeur de thèse

Ecole Doctorale : Sciences écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio-Ingénieries (SEVAB)

Unité de recherche : CIRAD-INRA, UMR15, Contrôle des maladies exotiques et émergentes, Montpellier, France.

Directeur de thèse : Professeur Xavier Berthelot, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

LES MEMBRES DU JURY

M. Philippe DORCHIES, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles, B.P. 87614, F-31076 Toulouse, cedex 3. Tél. +33(0) 51 61 19 38 71. Fax : +33(0) 5 61 19 39 44 E-mail : p.dorchies@envt.fr

M. Xavier BERTHELOT, Département Elevage et Produits et unité Mixte de recherches INRA-ENVT 1225 « Interactions Hôtes-Agents pathogènes » (IHAP) ; Ecole nationale vétérinaire, 23, chemin des Capelles, B.P. 87614, F-31076 Toulouse, cedex 3. Tél. : +33(0) 5 61 19 38 57 ; Fax : +33(0) 5 61 19 32 73 ; E-mail : x.berthelot@envt.fr

Mme Dominique LE GRAND, UMR Mycoplasmoses des Ruminants AFSSA-ENVL, Pathologie du bétail, Ecole vétérinaire de Lyon ; 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile. Tél : +33(0) 4 78 87 26 05 / Fax : +33(0) 4 78 87 26 06 ; E-mail : d.legrand@vet-lyon.fr

M. Serge MORAND, Institut des Sciences de l'Evolution – Montpellier, UMR-UM2-CNRS (UMR 5554), Université de Montpellier II- CC 065. 34095 Montpellier cedex 05 France. Tél. : +33(0)4 67 14 47 17, Fax : +33(0)4 67 14 36 10 ; E-mail : serge.morand@univ-montp2.fr

M. Pascal SIRAND-PUGNET, Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR 1090 Génomique Diversité Pouvoir Pathogène, INRA, IBVM, 71, Av. E. Bourlaux. B.P. 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex. Tél. : 33(0) 5 57 12 23 59. Fax : 33(0) 5 57 12 23 69. E-mail : sirand@bordeaux.inra.fr

M. François THIAUCOURT, CIRAD-INRA UMR15, Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes, TA A-15/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5 Tél. : +33(0)4 67 59 37 23 ; Fax : +33(0)4 67 59 37 98 ; E-mail : thiaucourt@cirad.fr

TABLE DES MATIERES

Chapitres	N° Pages
Table des matières	II
Remerciements	V
Résumé	VI
Summary	VII
Liste des publications	VIII
Abréviations	X
Liste des figures et tableaux	XII
Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique sur la PPCB, l'agent étiologique, le pouvoir pathogène et le typage des souches de MmmSC	4
I.1. La PPCB : définition, historique et importance	4
I.1.1. Définition	4
I.1.2. Historique	5
I.1.3. Importance de la PPCB	5
I.1.4. Surveillance et stratégies de lutte contre la PPCB	6
I.2. La PPCB en Afrique et au Cameroun	9
I.2.1. La PPCB en Afrique	9
I.2.2. Le Cameroun, son élevage et la situation de la PPCB	11
I.2.2.1. Situation du Cameroun et son élevage	11
I.2.2.2. Situation de la PPCB au Cameroun,	14
I.2.2.3. Moyens de lutte mis en place au Cameroun	16
I.3. <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	19
I.3.1. Classification	19
I.3.2. Le génome de <i>MmmSC</i> .	22
I.3.3. Identification de <i>MmmSC</i> au laboratoire	23
I.4 Typage des souches de <i>MmmSC</i> .	24
I.4.1. Typage basé sur les profils de restriction d'ADN	25
I.4.2. Typage basé sur des séquences d'insertion	25
I.4.3. Typage par amplification des fragments de restriction (AFLP)	26
I.4.4. Typage par la technique d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).	27
I.4.5. Typage par MLSA (Multilocus sequence analysis).	27
I.4.6. Typage par MLVA	28
I.5. Pouvoir pathogène de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC.	28
Conclusions	29

Chapitre II : Génotypage des souches de MmmSC par MLSA et VNTR : application à l'épidémiologie moléculaire de la PPCB	31
II.1 Introduction ;	31
II.2. Matériels et méthode ;	32
II.2.1. Souches de MmmSC ;	32
II.2.2. Sélection des locus pour le MLSA ;	35
II.2.3. Amplification et séquençage ;	35
II.2.4. Analyse des profils alléliques	36
II.2.5. Analyse épidémiologique	38
II.2.6. Amplifications et amorces pour le MLVA	38
II.2.7. Electrophorèse et analyse des résultats	39
II.2.8. Estimation de la taille des fragments.	39
II.3. Résultats de MLSA ;	41
II.3.1. Validation initiale ;	41
II.3.2. Robustesse du système MLSA	42
II.3.3. Allèles identifiés sur les différents locus	42
II.3.3.1. Allèles sur des séquences non codantes	42
II.3.3.2. Allèles sur des gènes dont la fonction est inconnue	46
II.3.3.3. Allèles sur le gène de ménage	50
II.3.4. Définition et répartition des profils alléliques	51
II.4. Résultats de typage par VNTR	56
II.4.1 Les allèles du locus VNTR TR39	57
II.4.2 Les allèles du locus VNTR TR 34	57
II.4.3 Les allèles du locus TR FT1	59
II.5. Résultats combinés MLSA et MLVA	60
II.6. Comparaisons du système MLSA aux autres méthodes de typage	61
II.7. Schéma simplifié de typage selon les régions.	64
II.8. Discussions	66
II.9. Conclusions	69
Chapitre III. Variabilité génétique des souches de MmmSC isolées dans les les provinces du Nord et de l'Extrême-Nord du Cameroun	71
III.1 Introduction	71
III.2. Matériels et méthode	72
III.2.1. Les souches et leur origine	72
III.2.2. Choix des locus, amplification, séquençage	73
III.3. Résultats	76
III.3.1. Les allèles du locus VNTR TR39	76
III.3.2. Les allèles du locus VNTR TR34	76

III.3.3. Les allèles du locus Loc-PG1-0001	78
III.3.4. Les allèles du locus Loc-PG1-0103	80
III.3.5. Analyse des profils observés	82
III.3.6. Les mouvements du bétail et la situation des foyers	83
III.3.7. Efficacité des mesures de lutte.	84
III.4. Discussions et Conclusions.	86
Chapitre IV : Etude comparée du pouvoir pathogène et du pouvoir immunogène des souches de MmmSC sur bovins par la voie sous-cutanée	89
IV.1. Introduction ;	89
IV.2. Matériels et méthode ;	91
IV.2.1. Les animaux ;	91
IV.2.2. Les souches de MmmSC ;	92
IV.2.3. Protocole et suivi expérimental ;	92
IV.3. Résultats	95
IV.3.1. Titrage des souches ;	95
IV.3.2. Validation du modèle sous-cutané ;	95
IV.3.3. Résultats de l'étude comparée de la virulence ;	100
IV.3.3.1. Groupe inoculé avec la souche T1B ;	100
IV.3.3.2. Groupe inoculé avec la souche T1BBC2 ;	101
IV.3.3.3. Groupe inoculé avec la souche T1BBC3 ;	102
IV.3.3.4. Groupe inoculé avec la souche T1-44 ;	104
IV.3.4. Etude du pouvoir immunogène des souches ;	105
IV.4. Discussions et conclusions ;	109
Conclusions générales ;	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122
ANNEXE I: Extrait de la loi de 2006 sur les maladies légalement contagieuses ;	133
ANNEXE II: Protocole standard d'inoculation des souches par la voie sous-cutanée ;	135
ANNEXE III: Article publié dans la revue Veterinary Research.	139

REMERCIEMENTS

Je remercie très vivement tous ceux qui m'ont apporté leur concours de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je remercie en particulier :

- Le Ministère Camerounais de l'Elevage, des pêches et des industries animales qui m'a autorisé à effectuer cette thèse ;
- Le Ministère français des affaires étrangères et le SCAC de l'ambassade de France au Cameroun pour l'octroi de la bourse ;
- Dr ABDOULKADIRI Souley, Directeur général du LANAVET qui a soutenu ce travail, autorisé les reproductions expérimentales dans son institution et apporté toutes les facilités pour l'aboutissement de ce travail ;
- Dr François THIAUCOURT, chef d'équipe de Bactériologie de l'UMR15 du CIRAD-BIOS qui m'a reçu dans son service et guidé ce travail de bout en bout ;
- Le CIRAD qui m'a accueilli dans ses laboratoires, financé une partie du travail et de séjour à Montpellier ;
- Le personnel du CIRAD du site de Baillarguet, en particulier l'équipe de Bactériologie de l'UMR15: Armelle PEYRAUD, Sophie LORENZON, Lucia MANSO-SILVAN, Maud PETIT, Virginie DUPUY ; le personnel de la formation : Martine GLADY-LAURENS et Marie-Caroline ESTIENNE pour leur disponibilité ;
- Tout le personnel du réseau d'épidémiologie PACE-Cameroun, en particulier Dr Nchare Amadou, Dr Baschirou Moussa, Dr Bakari Gambo et toutes les équipes de surveillance du Nord, de l'Adamaoua et de l'Extrême-Nord qui nous permis d'isoler certaines souches de mycoplasmes utilisées dans cette thèse;
- Dr Jean Jacques TULASNE auprès de qui, j'ai débuté ma carrière de vétérinaire de laboratoire et qui a soutenu ma candidature auprès de la Coopération française ;
- Tous mes collègues du LANAVET et en particulier ceux de la Pathologie Animale : messieurs DAIROU BABI, DICKMU JUMBO Simon, HAMADOU BAMANGA, HAMET MOUSSA, NGANGNOU André, TOUMBA Sylvestre, YANOUSSA ABDOU et YAYA DAOUDA pour leur disponibilité et leur concours dans le suivi des animaux. Tout le personnel du service d'Elevage du LANAVET pour le suivi et l'entretien des animaux : Golsia, Sirandi, Oussoumanou, Pascal et bien d'autres ;
- Aux confrères qui nous ont facilité l'acquisition des animaux en particulier Dr Hayatou Souley ;
- Le projet « EPIZONE », financé par l'Union Européenne ;
- Le projet FSP-Labovet qui a financé une partie des manipulations à Garoua, le voyage et mon séjour à Montpellier
- Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ce travail.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : Professeur Philippe Dorchies, Professeur Xavier Berthelot, Dr Pascal Sirand-Pugnet, Dr Serge Morand, Dr Dominique Le Grand, Dr François Thiaucourt.

Je remercie très vivement les membres du comité de thèse qui ont suivi le déroulement du travail : Professeur Alain BLANCHARD et Dr Christine CITTI.

A TOUS MERCI

RESUME

La péripneumonie contagieuse bovine, due à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC) sévit de façon enzootique en Afrique. La lutte contre cette maladie dans les pays pauvres se heurte à la faible efficacité des vaccins et aux difficultés d'application des mesures de prophylaxie sanitaire basées sur l'abattage des malades et infectés et le contrôle des mouvements du bétail. Pour les pays indemnes ou qui envisagent l'éradication, il est nécessaire de pouvoir distinguer l'origine des derniers foyers et notamment de savoir s'il s'agit de résurgence ou bien d'importation. A cet effet, un nouveau système de typage a été développé. Il est basé sur une analyse de séquences multilocus (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) pour un typage plus fin des souches de MmmSC et un suivi des foyers de PPCB. Des sites polymorphes ont été identifiés après étude des alignements des séquences de la souche de référence et celles d'une souche pathogène en cours de séquençage. Après validation sur quelques souches, huit locus ont été retenus. Dans un échantillon représentatif de 51 souches de diverses origines, le MLSA distingue trois groupes principaux et 31 profils alléliques différents. Les résultats obtenus montrent sans ambiguïté que les souches d'origine européenne ne résultent pas d'une importation. Le système MLSA a ensuite été affiné avec l'adjonction d'un locus comportant des séquences répétées en tandem (variable number of tandem repeats, VNTR). L'utilisation de deux locus MLSA et un locus VNTR a permis de typer 20 souches isolées au Nord-Cameroun. Les résultats obtenus ont montré une assez grande variabilité des profils de souches, ce qui est en accord avec la situation d'enzootie de la PPCB dans cette région. Finalement un modèle d'étude du pouvoir pathogène des souches de MmmSC a été validé. Il est basé sur une inoculation par voie sous-cutanée des souches de MmmSC et la mesure de la réaction de Willems et l'apparition de la fièvre. Le système est plus reproductible que la méthode de transmission par contact. L'inoculum est facilement contrôlable et les animaux peuvent être récupérés à la fin de l'étude pour la boucherie. En outre, il induit moins de souffrance animale. Les essais ont notamment confirmé que la souche PG1 n'était plus pathogène alors que la souche 8740-Rita l'était pleinement. La principale limitation du modèle reste la variabilité interindividuelle de sensibilité des bovins qui pourrait être diminuée avec l'augmentation du nombre d'animaux par groupe.

SUMMARY

Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC), is enzootic in Africa. The struggle to control CBPP in poor countries has been hampered by the low efficacy of the vaccines, the inability of veterinary services to apply prophylactic measures based on stamping-out policies and to control animal movements. For countries embarked on an eradication process, it would be necessary to ascertain the origin of the last outbreaks and determine if they are due to an importation or a resurgence. To address this issue, we developed a new Multilocus Sequence Analysis scheme (MLSA) which enabled a fine identification of MmmSC strains. This tool should, in turn, allow tracing back the source and origin of outbreak occurrences. The polymorphic sites were identified after the alignment of the sequences of the reference strain PG1 and that from strain 8740-Rita which was being sequenced. The suitability of these markers for genotyping was tested on a subset of five strains. At last, 8 loci were retained for the MLSA scheme and used for typing 51 strains of various origins (Europe, Africa, India and Australia). MLSA scheme identified three main groups and 31 allelic profiles. The results clearly showed that European strains did not emerge from importation. The discrimination power of the system was later improved by the inclusion of a VNTR (Variable Number Tandem Repeats) marker. Two MLSA loci and one VNTR locus were used which allowed us to genotype twenty strains isolated in northern Cameroon. The results indicated that there is a marked variability in the strains (7 types among 20 strains) circulating in Cameroon. The current finding is in accordance with the enzootic situation of CBPP in this region. And finally, a model for studying the MmmSC virulence was validated. The model was based on the sub-cutaneous inoculation of MmmSC strains and the measurement of the local reaction and fever. This method is more reproducible than the classical transmission of CBPP to contact animals as the inoculum can be easily controlled. At the end of the experiments, cattle can be treated and sent to the abattoirs. The model induces also less animal suffering. Our experiment confirmed that the strain 8740-Rita was highly pathogenic and the reference strain PG1 was completely avirulent. The main limitation of this method could be the variation of susceptibility among experimental cattle which could be overcome by increasing the number of animals per group.

LISTE DES PUBLICATIONS

YAYA A., MANSO-SILVAN L., BLANCHARD A., THIAUCOURT F., 2008. Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Res.* **39**(2) :14.

YAYA A., GOLSIA R., HAMADOU, AMARO A., THIAUCOURT F., 1999. Essai comparatif d'efficacité des deux souches vaccinales T1/44 et T1SR contre la péripneumonie contagieuse bovine. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, **52** (3-4) :171-179.

YAYA A., B. HAMADOU, D. YAYA, S. ABDOULKADIRI, F. THIAUCOURT. 2000. Inoculation expérimentale de l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine à des chèvres. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop*, **53** (4) :319-324.

THIAUCOURT F., YAYA A., WESONGA H., HUEBSCHLE O.J.B., TULASNE J.J., PROVOST A. 2000. Contagious bovine pleuropneumonia, a reassessment of the efficacy of vaccines used in Africa. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **916**:71-80.

THIAUCOURT F., ABOUBAKAR Y., WESONGA H., MANSO-SILVAN L., BLANCHARD A. 2004. Contagious bovine pleuropneumonia vaccines and control strategies: recent data. *Dev. Biol (Basel)*. **119**: 99-111.

TOTTE P., RODRIGUES V., YAYA A., HAMADOU B., CISSE O., DIALLO M., NIANG M., THIAUCOURT F., DEDIEU L. 2008. Analysis of cellular responses to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype associated with control of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Res.* **39** (1):8.

THIAUCOURT F., YAYA A., WESONGA H., DAVID S., 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.

DEDIEU L, BALCER-RODRIGUES V., YAYA A., HAMADOU B., CISSE O., DIALLO M., NIANG M., 2005. Gamma interferon producing CD4 T-cells correlate with resistance to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC infection in cattle. *Vet Immunology and Immunopathology*. **107**:217-233.

MARTRENCAR A., NJANPOP B. M., YAYA A., NJOYA A., TULASNE J. J., 1993. Problems associated with tuberculosis and brucellosis skin-test methods in northern Cameroon. *Prev. Vet. Med.*, **15**: 221-229.

MARTRENCAR A., BOUCHEL D., NJANPOP B. M., YAYA A., 1995. Utilisation de la souche B19 dans la prophylaxie médicale de la brucellose bovine au Nord-Cameroun. Etude de l'effet de la dose sur le taux et la durée de séroconversion chez des femelles zébus. *Revue Elev. Med. Vét. Pays trop.*, **48**(1) :37-40.

ABREVIATIONS

AA : Acide aminé ;

ADN : Acide désoxyribonucléique ;

AFLP: Amplified Fragments Length Polymorphism;

AIEA: Agence Internationale de l'Energie Atomique ;

AU/IBAR : African Union/Inter-African Bureau for Animal Resources;

BEAC : Banque des Etats de l'Afrique Centrale ;

CDS: coding sequence ;

CEMAC: Communauté Economique et Monétaire de l'Afrique Centrale ;

C-ELISA: Competitive Enzyme Link ImmunoSorbent Assay ;

dATP: désoxy adenine triphosphate ;

dGTP : désoxy guanine triphosphate ;

dCTP : désoxy cytosine triphosphate ;

dTTP : désoxy thymidine triphosphate;

dNTP: désoxy nucleotide triphosphate;

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acetic Acid ;

ELISA: Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay ;

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) ;

FCFA : Francs de la Communauté Financière Africaine ;

GC : Guanine –Cytosine ;

GPS : Global Positioning System;

GSEP : Projet de Gestion Sécurisée des Espaces Pastoraux ;

IgM : Immunoglobuline de classe M ;

kpb : kilo paires de bases ;

LANAVET : Laboratoire National Vétérinaire ;

LppQ-ELISA : Lipo-protéine LppQ-ELISA, ELISA indirecte basé sur l'antigène LppQ ;

MAKePS : Mammite, Arthrite, Kératite, Pneumonie, Septicémie ;

MEADEN : Mission d'Etude pour l'Aménagement et le Développement de la province du Nord ;

MLSA : Multilocus Sequence Analysis ;

MLST : Multilocus Sequence Typing ;

MLVA : Multilocus Variable Tandem-Repeats Analysis ;
MINEPIA : Ministère de l'Élevage, des Pêches et des Industries Animales ;
MmmSC : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony ;
MmmLC : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Large Colony ;
Mmc : *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* ;
IS : Insertion sequence (séquence d'insertion) ;
OIE : Office International des Epizooties (l'Organisation Mondiale de la Santé Animale)
PARC : PanaAfrican Rinderpest Campaign ;
PC15 : Programme Conjoint n° 15 ;
PP : Pourcentage de Positivité ;
PI : Pourcentage d'Inhibition ;
PPCB : Péripleurmonie Contagieuse Bovine ;
PBS : Phosphate Buffered Saline ;
Pb : Paires de bases ;
PACE : Programme Panafricain Contre les Epizooties ;
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis;
PCR : Polymerase Chain Reactions ;
PIB: Produit Intérieur Brut;
Q-PCR : Quantitative-Polymerase Chain Reactions ;
RCA : République Centrafricaine ;
RFC : Réaction de Fixation du Complément ;
RCM : Research Coordinated Meeting ;
SC: Small Colony;
SCAC: Service de la Coopération et d'Actions Culturelles;
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate –Polyacrylamide Gel Electrophoresis;
SNP : Single Nucleotide Polymorphism;
SVA: Institut National Vétérinaire(Uppsala, Suède);
TAE : Tris Acetate EDTA ;
UFC : Unités Formant Colonies ;
VNTR: Variable Number Tandem Repeats.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure I.1 : lésions de péripneumonie contagieuse bovine.	P4
Figure I.2 : carte de la distribution de la PPCB en Afrique.	P11
Figure I.3 : carte des densités du cheptel bovin au Cameroun.	P13
Figure I.4 : carte de localisation des foyers suspects de PPCB déclarés à la coordination nationale du PACE.....	P17
Figure I.5: colonies de mycoplasmes sur un milieu gélosé.	P20
Figure I.6 : arbre phylogénique des souches de mycoplasmes sur la base des séquences ARN16S.....	P21
Figure I.7 : différents groupes et profils alléliques obtenus avec le 1 ^{er} système MLSA.....	P28

Chapitre II

Figure II.1 : distribution des locus pour la pré-validation de MLSA sur le génome de PG1. .	P36
Figure II.2: établissement d'une courbe d'étalonnage avec un marqueur de poids moléculaire pour l'estimation de la taille des produits de PCR.....	P40
Figure II.3: carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0827.....	P44
Figure II.4 : alignement partiel des séquences du locus Loc-PG1-0827.....	P44
Figure II.5: carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0001.....	P45
Figure II.6: carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0287.	P45
Figure II.7 : carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0710.....	P46
Figure II.8 : alignement partiel des séquences sur un site polymorphe du locus Loc-PG1-0523.....	P47
Figure II.9: carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0523.....	P48
Figure II.10 : alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0103.....	P49
Figure II.11: carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0103.....	P49
Figure II.12 : alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0431.....	P50
Figure II.13: carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0431.....	P50
Figure II.14: alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0489.	P51
Figure II.15 : carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0489.....	P52
Figure II.16 : carte de la répartition des différents groupes et profils alléliques.....	P53

Figure II.17: résultats d'analyse par e-Burst, souches du groupe A.....	P54
Figure II.18: résultats d'analyse par e-Burst, souches des groupes B et C.....	P54
Figure II.19 : photo du gel d'électrophorèse vérifiant l'uniformité de la migration.....	P56
Figure II.20 : photo du gel d'électrophorèse des échantillons amplifiés sur le locus TR39...	P57
Figure II.21: carte de la distribution géographique des allèles du locus VNTR TR34.....	P58
Figure II.22 : photo d'un gel d'électrophorèse montrant la séparation échantillons amplifiés sur le locus VNTR TR34.....	P58
Figure II.23 : photo d'un gel d'électrophorèse montrant la séparation échantillons amplifiés sur le locus VNTR TR34.....	P59
Figure II.24 : gel photo d'un gel d'électrophorèse montrant la séparation échantillons amplifiés sur le locus VNTR TR34.....	P59
Figure II.25: photo d'un gel d'agarose montrant la migration des échantillons amplifiés sur le locus TRFT1.	P60

Chapitre III

Figure III.1 : origine des souches de MmmSC isolées au Cameroun.....	P74
Figure III.2: position des locus analysés sur le génome de la souche de référence PG1.....	P75
Figure III.3 : migration sur gel d'agarose à 5 % des échantillons amplifiés sur le locus TR 34.....	P77
Figure III.4 : alignement de séquences de quelques souches sur le locus TR34.....	P77
Figure III.5 : carte de la distribution des allèles du locus TR34 au Nord-Cameroun.....	P78
Figure III.6: alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0001.....	P79
Figure III.7 : carte de répartition des allèles du locus Loc-PG1-0001 au Nord-Cameroun....	P79
Figure III.8 : migration sur gel d'agarose à 5 % des échantillons amplifiés sur le locus Loc-PG1-0103.....	P80
Figure III.9 : alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0103.	P81
Figure III.10 : carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0103.....	P81
Figure III.11 : carte de la distribution des différents profils alléliques.....	P83
Figure III.12 : carte des pistes à bétail dans le Nord et Extrême-Nord.....	P85
Figure III.13 : carte de circulation probable du profil F dans le Nord.	P86

Chapitre IV

Figure IV.1 : cinétique des températures des animaux inoculés avec la souche 8740-Rita....	P96
Figure IV.2 : évolution de la taille de la réaction locale, groupe 8740-Rita.....	P97
Figure IV.3 : réactions locales au point d'inoculation avec la souche PG1.....	P97
Figure IV.4 : index de pathogénicité des souches PG1 et 8740-Rita.....	P98
Figure IV.5 : index individuels de pathogénicité des souches PG1 et 8740-Rita.....	P98
Figure IV.6: phénomène de Willems au point d'inoculation chez l'animal 128.....	P99
Figure IV.7: phénomène de Willems au point d'inoculation chez les animaux 138 et 125....	P99
Figure IV.8 : réactions locales induites par la souche T1B.....	P100
Figure IV.9 : courbes de températures des animaux inoculés avec la souche T1B.....	P101
Figure IV.10 : évolution des températures des animaux du groupe T1BBC2.....	P101
Figure IV.11 : réactions locales induites par la souche T1BBC2.....	P102
Figure IV.12: courbes de températures des animaux inoculés avec la souche T1BBC3.....	P102
Figure IV.13 : évolution des températures des animaux inoculés avec la souche T1BBC3..	P103
Figure IV.14 : phénomène de Willems chez l'animal 104, 24 jours après inoculation de la souche T1BB-C3.....	P103
Figure IV.15 : réactions locales induites avec la souche vaccinale T1-44.....	P104
Figure IV.16 : courbes de températures des animaux inoculés avec la souche T1-44.....	P104
Figure IV.17: cinétique des anticorps en C-ELISA et LppQ –ELISA chez les animaux inoculés avec la souche 8740-Rita.....	P105
Figure IV.18 : réactions locales des animaux contrôles inoculés avec la souche 8740-Rita.	P106
Figure IV.19 : évolution du diamètre de la réaction locale des animaux inoculés avec la souche 8740-Rita et éprouvés avec la même souche 2 mois plus tard.....	P107
Figure IV.20 : histogramme des index de virulence lors de la 2 ^e inoculation de la souche 8740- Rita.....	P107

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I.1 : évolution des différents cheptels de 2000 à 2005.....	P13
Tableau I.2 : liste des suspicions de foyers de PPCB déclarés aux services vétérinaires de 2005 à 2007.....	P15
Tableau I.3 : les mycoplasmes du groupe « mycoides ».	P20

Tableau I.4 : caractères biochimiques de MmmSC.	P23
--	-----

Chapitre II

Tableau II.1 : liste des souches étudiées et leur origine.....	P33
Tableau II.2 : liste des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage pour le système MLSA.....	P37
Tableau II.3 : liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR pour validation du système MLVA.....	P39
Tableau II.4 : matrice des différents profils alléliques.....	P43
Tableau II.5 : récapitulation des polymorphismes sur le locus Loc-PG1-0710.....	P46
Tableau II.6 : récapitulation des sites polymorphes du locus Loc-PG1-0523.	P48
Tableau II.7: récapitulatif des sites polymorphes du locus Loc-PG1-0103.	P48
Tableau II.8: récapitulation des sites polymorphes du locus Loc-PG1-043.....	P51
Tableau II.9: récapitulatif des polymorphismes observés sur l'ensemble des souches au niveau des 8 locus étudiés.....	P55
Tableau II.10: apport du locus VNTR TR34 dans la distinction de certains groupes.....	P61
Tableau II.11: pouvoir discriminant des méthodes de typage utilisées sur les souches de MmmSC.....	P62
Tableau II.12: résultats de typage effectué par différentes méthodes sur les mêmes souches.	P63
Tableau II.13 : liste des marqueurs pour le typage des souches en fonction des régions géographiques.	P65

CHAPITRE III

Tableau III.1 : souches de MmmSC étudiées et leur origine.....	P73
Tableau III.2: séquences des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage.....	P75

CHAPITRE IV

Tableau IV.1: résultats du titrage des souches avant inoculation.....	P95
Tableau IV.2: index de pathogénicité lors de la première inoculation de la souche 8740-Rita.	P107
Tableau IV.3 : index de pathogénicité lors de la deuxième inoculation (contrôles positifs) de la souche 8740-Rita.....	P108

INTRODUCTION

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est une maladie infectieuse, contagieuse, inoculable due à un mycoplasme, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC). C'est l'une des maladies qui menacent le plus le cheptel bovin en Afrique sub-saharienne depuis que la peste bovine, qui était il y a quelques années la maladie la plus meurtrière de l'espèce est en voie d'éradication.

La PPCB sévit de façon enzootique depuis plusieurs années en Afrique intertropicale et elle induit des pertes difficiles à évaluer à cause de son évolution insidieuse. Autrefois sous contrôle grâce aux campagnes de vaccination mixte anti-bovipestique–antipéripneumonique, la péripneumonie a connu une recrudescence depuis l'arrêt de la vaccination antipestique. Malheureusement, les efforts de lutte ont connu un relâchement entraînant une flambée des cas. La lutte contre cette maladie en Afrique subsaharienne est rendue difficile par la faible efficacité des vaccins disponibles et par la paupérisation des Etats qui ne peuvent pas mettre en œuvre les mesures d'abattage systématique des troupeaux contaminés ou qui ne peuvent pas contrôler les mouvements du bétail. La mise au point de nouveaux vaccins plus efficaces et dénués de pouvoir pathogène résiduel, nécessiterait que les mécanismes du pouvoir pathogène et du pouvoir immunogène soient élucidés. La publication de la séquence complète du génome de la souche de référence PG1 en 2004 (Westberg et al., 2004) a permis le développement de nombreux outils de diagnostic et d'épidémiologie. Elle offre en outre, des possibilités d'investigation sur le pouvoir pathogène de MmmSC par génomique comparative entre des souches pathogènes et des souches qui ne le sont plus.

Le Cameroun fait partie des pays africains touchés par la PPCB. Situé au fond du golfe de Guinée, il s'étend de l'océan atlantique au lac Tchad sur une superficie de 475 442 km² et compte une population de plus de 16 millions d'habitants. Son économie, essentiellement agricole, est basée sur la culture du cacao, du coton, du café et de la banane plantain. Le secteur élevage contribuerait pour 30 % au PIB (produit intérieur brut) agricole. Le cheptel bovin compte environ 6,5 millions de têtes réparties principalement dans les trois régions septentrionales (l'Adamaoua, le Nord et l'Extrême-Nord). L'élevage bovin fait face, entre autres difficultés, aux problèmes des points d'abreuvement (au Nord et à l'Extrême-Nord), à la raréfaction des pâturages et aux problèmes de maladies infectieuses tels la fièvre

aphteuse, la septicémie hémorragique, les trypanosomoses, la dermatophilose, le charbon bactérien, le charbon symptomatique, la brucellose et la péripneumonie contagieuse bovine. Pour compléter son arsenal de lutte contre les maladies animales majeures, le Cameroun a créé en 1983 (MINEPIA, 1983), le Laboratoire National Vétérinaire (LANAVET) dont le siège est à Garoua. Cette institution est chargée du diagnostic et de la surveillance épidémiologique des maladies animales, de la production des vaccins à usage vétérinaire et de la collaboration avec des organismes étrangers en charge des questions de santé animale. Dans le cadre de coopération avec le CIRAD (Centre de Coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement), des projets de recherche sur certaines maladies animales ont été menés (la peste des petits ruminants, la peste bovine, les poxviroses et la péripneumonie contagieuse bovine). Les études sur la PPCB avec le CIRAD ont porté sur la caractérisation des cellules intervenant dans la réponse immunitaire (Dedieu et al., 2005 ; Totté et al., 2008), l'efficacité des souches vaccinales T1 utilisées contre la PPCB (Yaya et al., 1999 ; Thiaucourt et al., 2000) et la virulence des souches de *MmmSC* sur des caprins (Yaya, 2000). C'est dans le cadre d'une telle coopération qu'une bourse du ministère français des affaires étrangères a été sollicitée et obtenue pour une thèse en alternance entre le LANAVET (Garoua, Cameroun) et le CIRAD (Montpellier, France).

Le principal objectif du travail était d'étudier le polymorphisme des souches de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Le point de départ de cette étude a été la comparaison du génome de la souche PG1 avec les séquences obtenues sur une souche d'origine camerounaise (8740-Rita). Le polymorphisme observé devait servir d'une part à développer de nouveaux systèmes de typage et d'épidémiologie moléculaire et d'autre part à identifier des gènes potentiellement liés à la virulence. *In fine*, il était envisagé d'obtenir des mutants délétés sur certains gènes grâce à l'utilisation des vecteurs OriC et de tester la virulence résiduelle de ces mutants au Cameroun. Malheureusement, les équipes de recherche utilisant les vecteurs OriC n'ont pas pu obtenir de mutants par recombinaison homologe chez *MmmSC*. Une des explications possibles est l'existence chez *MmmSC* d'un certain nombre de gènes liés à la recombinaison, comme *recG*, qui sont altérés. Ainsi le travail qui devait se faire au Cameroun a été ré-orienté vers la caractérisation de la virulence des souches de *MmmSC*. Cet objectif était également important car c'est un pré requis pour des études ultérieures. En effet, jusqu'à présent, toutes les publications traitant de la virulence des souches de *MmmSC* se basent sur des hypothèses qui sont difficilement

vérifiables. Les observations de terrain sont d'une part très partielles (voire inexistantes) et d'autre part difficiles à interpréter étant donnée la variabilité des situations locales.

Ce travail comprend quatre chapitres:

Le chapitre I est consacré aux données bibliographiques sur la PPCB (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, pouvoir pathogène) et sa situation en Afrique et au Cameroun.

Le chapitre II aborde le polymorphisme génomique des souches de MmmSC : le développement d'un nouveau système de typage des souches par le système MLSA (Multilocus Sequence Analysis) et la validation de la technique MLVA (Multilocus Variable number tandem repeat Analysis) développée par d'autres équipes de recherche.

Le chapitre III est consacré au typage des souches de MmmSC isolées dans les régions septentrionales du Cameroun (Nord et Extrême Nord).

Le chapitre IV est consacré à la validation d'un modèle d'inoculation des souches par la voie sous-cutanée pour l'étude de la virulence de MmmSC et à une étude comparative du pouvoir pathogène et du pouvoir immunogène de certaines souches de *MmmSC*.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PPCB : SITUATION DE LA PPCB EN AFRIQUE ET AU CAMEROUN, L'AGENT ETIOLOGIQUE, LE POUVOIR PATHOGENE, LE TYPAGE DES SOUCHES DE MmmSC.

I.1. LA PPCB : DEFINITION, IMPORTANCE ECONOMIQUE

I.1.1. Définition

La péripneumonie contagieuse bovine est une maladie infectieuse, contagieuse, transmissible, due à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC). Elle est caractérisée sur le plan clinique par des troubles respiratoires (toux, dyspnée, jetage), des troubles articulaires (boiteries) chez les jeunes de moins de deux ans et sur le plan lésionnel par une pneumonie et une pleurésie exsudatives, séro-fibrineuses dans des cas aigus et par la présence des séquestres pulmonaires dans des cas chroniques. Elle affecte essentiellement les bovins (*Bos indicus*, *Bos taurus*) et les buffles domestiques (*Bubalus bubalus*). Les buffles sauvages (*Syncerus caffer*) ne sont pas atteints dans les conditions naturelles. Les autres espèces domestiques ne sont pas sensibles même si MmmSC peut être isolé chez les petits ruminants (Provost, 1987 ; Egwu et al., 1996 ; Lefèvre, 2000).

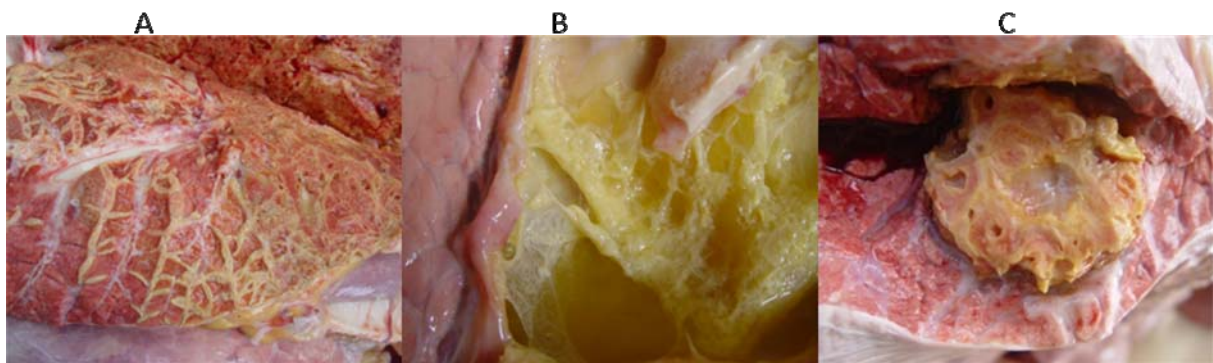


Figure I.1 : lésions de péripneumonie contagieuse bovine.

En A, poumon hépatisé avec un épaissement des travées inter-lobulaires. En B, une pleurésie exsudative avec dépôt de fibrine et présence d'un exsudat (liquide pleural). En C, présence d'un séquestre dans les poumons. L'épaississement des travées inter-lobulaires est visible en périphérie du séquestre (photo : F. Thiaucourt, LANAVET, Garoua, 1999).

I.1.2. Historique.

De nombreuses publications ont été consacrées à l'historique de la PPCB (Curasson, 1942 ; Provost et Joubert, 1970) soulignant le rôle qu'elle a joué dans l'histoire de la médecine vétérinaire. Provost et Joubert ont résumé l'histoire de la PPCB en cinq points : « première édification d'un établissement public de lutte anti-infectieuse, démonstration de la contagiosité, réussite de la première culture in vitro d'un « virus filtrable », application ancestrale chez l'animal d'une vaccination de type jennérien par un « virus » homologue intégral et première réglementation d'éradication par abattage » (Provost et Joubert, 1970).

I.1.3. Importance de la PPCB.

La peste bovine a longtemps été considérée comme la principale menace du cheptel en Afrique. Après le succès des campagnes d'éradication de cette maladie basées sur la vaccination à grande échelle, les services vétérinaires des pays africains considèrent la PPCB comme une de leurs priorités. Cependant, pour de nombreuses raisons, il est difficile d'évaluer les pertes occasionnées par cette maladie.

Au Nigeria, les pertes économiques dues à la PPCB ont été estimées en 1981 à 3,6 millions de dollars (Osiyemi, 1981). Pour le nord du Nigeria, Egwu a estimé les pertes directes à 1.5 millions de dollars (Egwu et al., 1996). Les pertes annuelles directes ou indirectes attribuables à la PPCB se chiffrent pour tout le continent africain à 2 milliards de dollars (Masiga et al., 1996). Depuis la réapparition de la PPCB en Tanzanie en 1990, les pertes directes liées à cette maladie (mortalités, campagnes de vaccination, surveillance) s'élèveraient jusqu'en 2001, à 11 millions de dollars. Les pertes indirectes dues à la forme chronique, difficilement chiffrables, seraient plus élevées (Msami et al., 2001). Plus récemment, Tambi et collaborateurs ont évalué les pertes causées par la PPCB dans 12 pays africains au sud du Sahara (Burkina, Tchad, Côte d'Ivoire, Ethiopie, Ghana, Guinée, Mali, Mauritanie, Niger, Tanzanie et Ouganda) à 44,8 millions d'Euros. Selon ces auteurs, un investissement de 14,7 millions d'euros pour le contrôle de la maladie dans les douze pays concernés permettrait d'épargner 30 millions d'euros soit plus de 1.6 milliards de Francs CFA. Ces estimations ont été faites sur la base d'une évolution chronique de la maladie. Le ratio bénéfice/coût du contrôle par la vaccination varie de 1,61 à 2,56. (Tambi et al., 2006). En Ethiopie, une analyse du bénéfice/coût a montré qu'en cas de vaccination associée à un traitement antibiotique, le ratio était de 47,6 soit un birr investi pour un gain

de 47,6 birrs. Cette étude a été menée dans des troupeaux traditionnels de la région de 'West Wollega' (Laval, 2003).

Tous ces chiffres ne sont pourtant que des estimations. En effet, de nombreux réseaux d'épidémiologie-surveillance en Afrique sub-saharienne ne sont pas très fiables malgré les efforts conséquents du programme PACE. Il est certain que très peu de foyers sont déclarés et peu d'enquêtes sont diligentées pour estimer les pertes enregistrées. Les éleveurs n'ont souvent pas d'intérêt direct à déclarer les foyers et préfèrent avoir recours à des traitements antibiotiques pour limiter leurs pertes même si c'est contraire à la réglementation et malgré le doute sur l'efficacité de tels traitements.

La PPCB reste une menace pour les pays indemnes et notamment pour l'Europe comme l'ont montré les différents épisodes d'apparition de la maladie en 1935, 1953, 1967, 1982 et plus récemment dans les années 1990. Entre 1990 et 1993, l'Italie a dû abattre 17 245 têtes de bovins pour retrouver le statut de pays indemne de PPCB (Belloli et al., 1994 ; Regalla et al., 1996). En ce qui concerne le Portugal, le dernier foyer de PPCB a été confirmé en 1999. Ces quelques chiffres montrent l'importance économique de la PPCB.

I.1.4. Surveillance et stratégies de lutte contre la PPCB.

Surveillance

Il n'est pas question ici de développer longuement ce sujet qui a été traité par ailleurs mais simplement de rappeler quels sont les outils disponibles.

La surveillance de la PPCB peut s'appuyer sur plusieurs outils. Tout d'abord le savoir des éleveurs. En effet, la PPCB est souvent très bien connue des éleveurs, notamment des Peuls pour qui le troupeau de bovins est la base de leur subsistance. Ainsi des enquêtes participatives peuvent éventuellement apporter des informations utiles. Cependant ces enquêtes peuvent subir un certain nombre de biais si elles ne sont pas réalisées selon les règles et si elles ne bénéficient pas de la pleine coopération des éleveurs qui peuvent y voir un moyen détourné de l'Etat pour mieux percevoir les taxes sur bétail. Dans les pays où le cheptel est abattu dans des abattoirs contrôlés, l'observation de lésions chroniques pulmonaires permet d'évaluer grossièrement la prévalence de la maladie et de diligenter des enquêtes si l'origine géographique des animaux est connue. Cependant dans de nombreux pays africains, cette technique a des limites évidentes car les animaux malades seront le plus souvent abattus sur place sans surveillance sanitaire. Les foyers de PPCB peuvent être identifiés par les techniciens ou les vétérinaires sur le terrain. En effet les

lésions aiguës au niveau des poumons sont pathognomoniques et ne prêtent quasiment pas à confusion. Cependant, des autopsies ne sont pas toujours pratiquées et il est fréquent que des traitements antibiotiques soient instaurés sans qu'un diagnostic précis n'ait été porté. La confirmation des foyers devra le plus souvent se faire au laboratoire et ne pose théoriquement pas de problème. La détection de l'agent pathogène peut se faire directement à partir des lésions en utilisant la technique de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Dedieu et al., 1994 ; Bashiruddin et al., 1994) voire de PCR en temps réel (RT-PCR) (Gorton et al. 2005 ; Lorenzon et al. 2008). Ces deux techniques sont spécifiques et extrêmement sensibles. Comme les prélèvements (du liquide pleural de préférence) peuvent être séchés, l'absence de chaîne du froid n'est pas une contrainte majeure. La réussite de l'isolement de l'agent pathogène à partir des lésions aiguës dépend de la façon dont les prélèvements ont été récoltés et transportés. Enfin, à posteriori, il est possible de confirmer les foyers voire d'établir des cartes de prévalence et d'incidence grâce à la sérologie. La confirmation des foyers peut être obtenue rapidement « au pied de l'animal » par la technique d'agglutination rapide sur lame à condition d'intervenir dans les semaines qui suivent le début du foyer (Turner et al., 1963 ; Perreau et al., 1963 ; March et al., 2003). La réaction de fixation du complément (RFC) est, quand à elle, la technique de référence la plus ancienne pour l'OIE (Campbell et al., 1953). Elle permet de détecter des anticorps pendant environ 6 mois (elle détecte en effet surtout des IgM), ce qui lui donne une bonne sensibilité précoce mais cette sensibilité diminuera au cours du temps. La RFC donne un certain pourcentage de faux positifs (de 0,1 à 4% environ), ce qui peut poser un problème sérieux pour les pays indemnes. C'est pourquoi les autorités vétérinaires portugaises, à la fin de la campagne d'éradication dans les années 90, ont utilisé le « Western Blot » comme test complémentaire sur les troupeaux dès qu'un sérum était trouvé positif en RFC. Ce test de Western Blot est malheureusement assez lourd à réaliser et difficile à standardiser pour être utilisé en routine. Enfin, depuis environ une décennie, le test ELISA de compétition (Le Goff et Thiaucourt, 1998) est disponible commercialement (Institut Pourquier, Montpellier, France). L'avantage de ce test est d'être plus spécifique que la RFC grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal. Des résultats récents obtenus en Zambie (Mwambazi, 2008) sur des animaux abattus dans le cadre d'un assainissement de foyers de PPCB ont montré que ce test était également plus sensible que la RFC et qu'un autre test ELISA (Bruderer et al. 2002) basé sur l'utilisation de la protéine LppQ.

Stratégies de lutte

Les stratégies de lutte contre la PPCB s'appuient sur une série d'outils :

- l'abattage des animaux (au niveau individuel, du troupeau ou du cheptel d'une région) ;
- le contrôle des mouvements d'animaux ;
- l'utilisation de vaccins ;
- l'utilisation de traitements antibiotiques.

De multiples exemples historiques ont montré qu'il était possible d'éradiquer la maladie à condition d'utiliser une combinaison des trois premiers outils (Newton, 1992). Le succès et la rapidité de cette éradication a toujours dépendu de l'application très stricte de ces mesures et donc des moyens politiques et financiers mis en œuvre. Les vaccins utilisés actuellement en Afrique, les souches T1 (T1-44 et T1-SR), ont été développés dans les années 1950 par atténuation empirique par passages sur œufs embryonnés (Sheriff et Piercy, 1952). Ces vaccins ne donnent une immunité satisfaisante que s'ils sont administrés de façon régulière au cheptel (en général annuellement). Cependant l'utilisation exclusive de ces vaccins n'a jamais permis l'éradication de la PPCB. Leur utilisation systématique a servi à diminuer la prévalence de la maladie avant de pouvoir appliquer des mesures strictes d'abattage sanitaire.

En Afrique, à l'heure actuelle, la situation socio-économique ne permet souvent pas d'envisager les mesures d'abattage et de contrôle des mouvements d'animaux, en tout cas pas à l'échelle d'un pays ou d'une région. Les perspectives d'éradication sont donc faibles et c'est pourquoi certains ont suggéré de reconsidérer l'utilisation des traitements antibiotiques (Roeder and Rweyemamu, 1995). Pourtant l'utilisation de ceux-ci est interdite par certaines législations nationales en raison du risque possible de développement de porteurs chroniques. Dans le passé, ces traitements à base de tétracyclines ou de macrolides ont été utilisés pour traiter les animaux présentant des réactions post-vaccinales (Revell, 1973). Ces réactions sont principalement observées lors de l'utilisation de la souche T1-44 dans des troupeaux vaccinés pour la première fois (Windsor et al., 1976). Peu d'études ont été réalisées pour mesurer exactement ce qu'il était possible d'attendre de ces traitements. Il semble que les tétracyclines puissent améliorer l'état clinique des animaux mais ils n'empêchent pas le portage de MmmSC. L'utilisation de traitements à base de fluoroquinones, au contraire, n'a pas permis d'amélioration sensible de l'état des animaux atteints mais elle a ralenti la transmission de

la maladie à des animaux naïfs mis en contact avec les animaux traités (Huebschle et al., 2006).

I.2. LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE EN AFRIQUE ET AU CAMEROUN

I.2.1. PPCB en Afrique.

L'origine de la PPCB en Afrique n'est pas clairement établie. Pour certains, elle a été introduite à la faveur d'importations de bovins en provenance d'Europe au 19^{ème} siècle. Le cas est avéré pour l'Afrique australe. Pour d'autres, elle pré-existait à la colonisation comme pourraient le laisser penser les pratiques ancestrales de vaccination traditionnelle observées chez les Peuls au Sénégal (de Rochebrune, 1885). La seule partie du continent qui a toujours été épargnée est l'Afrique du Nord.

Durant la colonisation, la PPCB a été considérée comme une priorité et de nombreux travaux ont d'ailleurs été réalisés sur le développement des vaccins, tant à Muguga (Kenya), siège de l'East African Veterinary Research Organisation (Masiga et Windsor, 1975), qu'à Farcha au Tchad (Provost, 1967), à Vom au Nigéria ou à Dakar au Sénégal (Doutre, 1969). Un certain nombre de pays ont même réussi à éradiquer la maladie, notamment par des pratiques d'abattage systématique, en Afrique australe (Afrique du Sud, Botswana, sud de la Namibie, Zambie) ou en Afrique de l'Est (Ouganda, Tanzanie).

Pendant la phase du projet conjoint PC15 au début des années 1960 et le projet PARC, la PPCB était relativement contrôlée en Afrique et avait même disparu de certaines régions grâce aux campagnes de vaccination avec le vaccin mixte contre la peste bovine et la péripneumonie contagieuse bovine (Masiga, 1996). Depuis le début des années 1990, avec l'arrêt de la vaccination contre la peste bovine et aussi la diminution des moyens alloués aux services vétérinaires, la situation de la PPCB a radicalement changé dans de nombreux pays. Elle a notamment été réintroduite dans un certain nombre de pays qui étaient indemnes depuis des décennies (Botswana, Zambie, Tanzanie, Ouganda, Rwanda). A cette occasion, les pertes directes liées à la maladie ont été énormes, auxquelles se sont ajoutées les pertes indirectes liées à la lutte (campagnes de vaccination massives au Rwanda et en Tanzanie, abattage de 320000 têtes de bétail au Botswana). Depuis, seul le Botswana a réussi à redevenir indemne (Mullins et al., 2000) et la PPCB est redevenue enzootique dans l'Est de l'Afrique.

En 2007, 19 pays africains (Angola, Benin, Burkina Faso, Burundi, Cameroun, Ethiopie, Kenya, Mali, Tchad, Namibie, RDC, RCA, Ghana, Niger, Nigéria, Tanzanie, Togo, Ouganda, Zambie) ont déclaré officiellement des cas de PPCB à l'OIE (www.oie.intel). Tous les pays ne déclarant pas des cas à l'OIE, la répartition de la maladie en Afrique est nettement plus grande. Les zones où il est avéré que la PPCB n'existe pas sont l'Afrique du Nord, les pays ou régions insulaires (Madagascar, Maurice, Comores, Zanzibar) et l'Afrique Australe au sud d'une ligne passant par le Nord de la Namibie, la frontière Nord du Botswana, du Zimbabwe et du Mozambique. Partout ailleurs, elle est enzootique et son importance est directement liée à l'importance du cheptel bovin. Les zones forestières et les zones où sévit la mouche tsé-tsé sont forcément moins touchées puisque l'élevage bovin y est plus difficile. L'Afrique australe maintient son statut indemne grâce à des barrières très strictes empêchant l'introduction de bétail vivant en provenance des zones infectées (par exemple double barrière de barbelés au Nord de la Namibie). L'Afrique du Nord est protégée par une barrière naturelle, le Sahara mais l'introduction récente de la peste des petits ruminants au Maroc (www.fao.org/docs/eims) laisse penser que cette barrière n'est pas hermétique et que le risque de pénétration de la PPCB en Afrique du nord n'est pas nul. Il en est de même de Madagascar qui est protégée par son insularité mais qui pourrait être infectée par du commerce illégal en provenance du continent à travers les Comores.

La situation réelle de la PPCB dans les pays où elle sévit de façon enzootique est très difficile à apprécier (figure n° I.2). Au contraire des pays développés, la majeure partie du cheptel n'est pas abattue dans des abattoirs où se fait une surveillance des lésions. Les foyers existant ne sont pas signalés de façon exhaustive et aucune enquête sérologique d'envergure n'a été réalisée. Il est très probable d'ailleurs que la prévalence, l'incidence et les pertes économiques varient beaucoup d'un pays ou d'une zone à une autre reflétant la variabilité des systèmes d'élevage, des législations et des pratiques de lutte instaurées tant par les éleveurs que par les Etats.

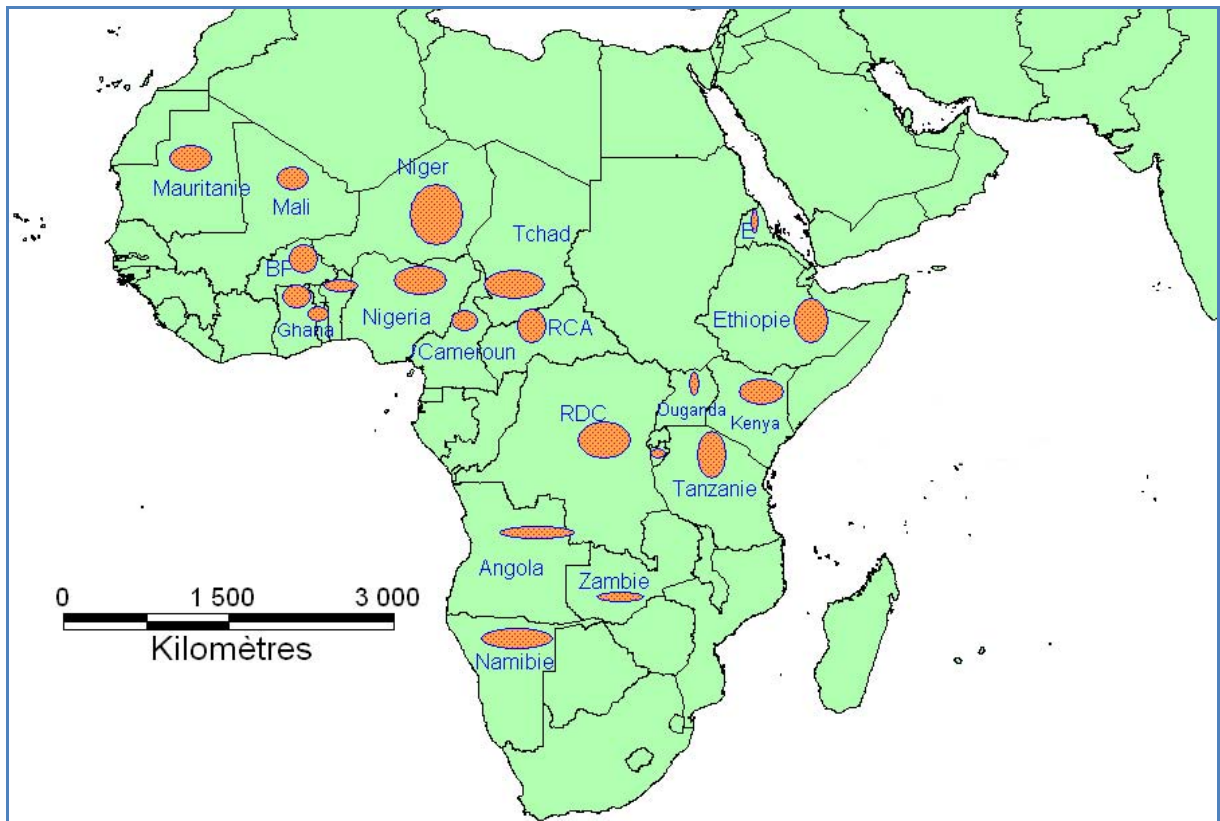


Figure I.2 : carte de la répartition de la PPCB en Afrique.

La PPCB sévit essentiellement en Afrique intertropicale. Les pays ayant déclaré des cas de PPCB à l'OIE de 2005 à 2007 sont indiqués sur la carte par (●).

I.2.2. Le Cameroun, son élevage et la situation de la PPCB.

I.2.2.1. Situation du Cameroun et son élevage.

Le Cameroun est situé au fond du golfe de Guinée, de l'océan atlantique au lac Tchad sur une superficie de 475442 km² et compte une population d'environ 16 296 000 d'habitants. L'économie du Cameroun est essentiellement agricole. Le produit intérieur brut (PIB) de 2005 est évalué à 8770.7 milliards de francs CFA soit 13,37 milliards euros (BEAC, 2005). Il contribue pour 44 % au PIB des pays de la CEMAC. Le PIB du secteur primaire valait en 2005 (BEAC, 2005), 2239 milliards de FCFA. Le secteur élevage, chasse et piégeage qui contribue pour 9.3 % (BEAC) au PIB du secteur primaire, n'est pas négligeable. Selon les statistiques du Ministère de l'Élevage, des Pêches et des Industries Animales (MINEPIA), le secteur élevage contribuerait pour 20 % au PIB agricole et procurerait des revenus à 30 % de la population à qui, il assure la sécurité alimentaire, l'épargne, la force de travail et la fertilisation des champs (PACE-Cameroun, 2007). Les effectifs des cheptels

varient selon les sources avec des marges très importantes : 6 millions de têtes de bovins pour le ministère de l'élevage, des pêches et des Industries animales, 3 678 000 têtes pour la Banque des Etats de l'Afrique Centrale (BEAC, 2005), 5 600 000 têtes pour la FAO, etc. Cette disparité des chiffres souligne la nécessité d'un recensement plus rigoureux du cheptel national. La production annuelle de viande est estimée à 219000 tonnes par an (FAO, 2005) soit un peu plus de 13 kg par habitant et par an.

On distingue trois systèmes d'élevage dans les régions septentrionales (Njoya et al. 1995) :

- le système transhumant : les troupeaux se déplacent en saison sèche d'octobre à décembre ;
- le système semi-sédentaire : ce sont surtout les éleveurs-agriculteurs. Ils vont vers les plaines inondables après la récolte de leurs cultures. La distance moyenne de leur déplacement est de 10 à 30 km. Ils utilisent une main d'œuvre salariée pour les cultures et une main d'œuvre familiale pour le gardiennage des troupeaux.
- Le système sédentaire : les déplacements sont courts (10 km). Ce système est pratiqué par des agro-éleveurs.

Dans l'Adamaoua (40 % du cheptel national) où la culture du coton est marginale, l'élevage représente la première activité rurale. Les régions du Nord et de l'Extrême-nord comptent 38 % du cheptel national (Njoya et al., 1995) et l'élevage est la deuxième source de revenus pour les populations rurales après le coton. Mais depuis 1993, la dégradation des pâturages, l'augmentation des prix des intrants et l'exportation frauduleuse des bovins vers les pays voisins ont entraîné une flambée vertigineuse du prix du kilogramme de viande bovine dans cette région (Tchotsoua et Djeumene, 2002). Cette situation a été accentuée avec la recrudescence de l'insécurité ayant entraîné l'émigration de nombreux éleveurs Mbororo vers le Nigéria voisin. D'après Saïbou citant le bureau du HCR à Yaoundé, entre avril 2005 et juillet 2006, environ 20.000 personnes auraient quitté leurs villages situés dans le nord-est du Cameroun, dans le nord de la RCA, ou dans le sud-ouest du Tchad, après plusieurs attaques des coupeurs de route ou d'autres groupes armés (Saïbou, 2006).

Espèces/Années	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Bovins	3431	3399	3469	3563	3620	3678
Ovins et caprins	4880	4880	4880	4880	4880	4880
Porcins	512	501	524	538	553	567
Volailles	11612	11476	11774	12057	12346	12964

Tableau I.1 : évolution des différents cheptels de 2000 à 2005 en milliers de têtes. Les nombres indiqués ne sont que des approximations car le bétail n'est pas identifié individuellement au Cameroun et il n'est pratiquement pas possible d'effectuer un recensement précis. Source : BEAC, 2005.

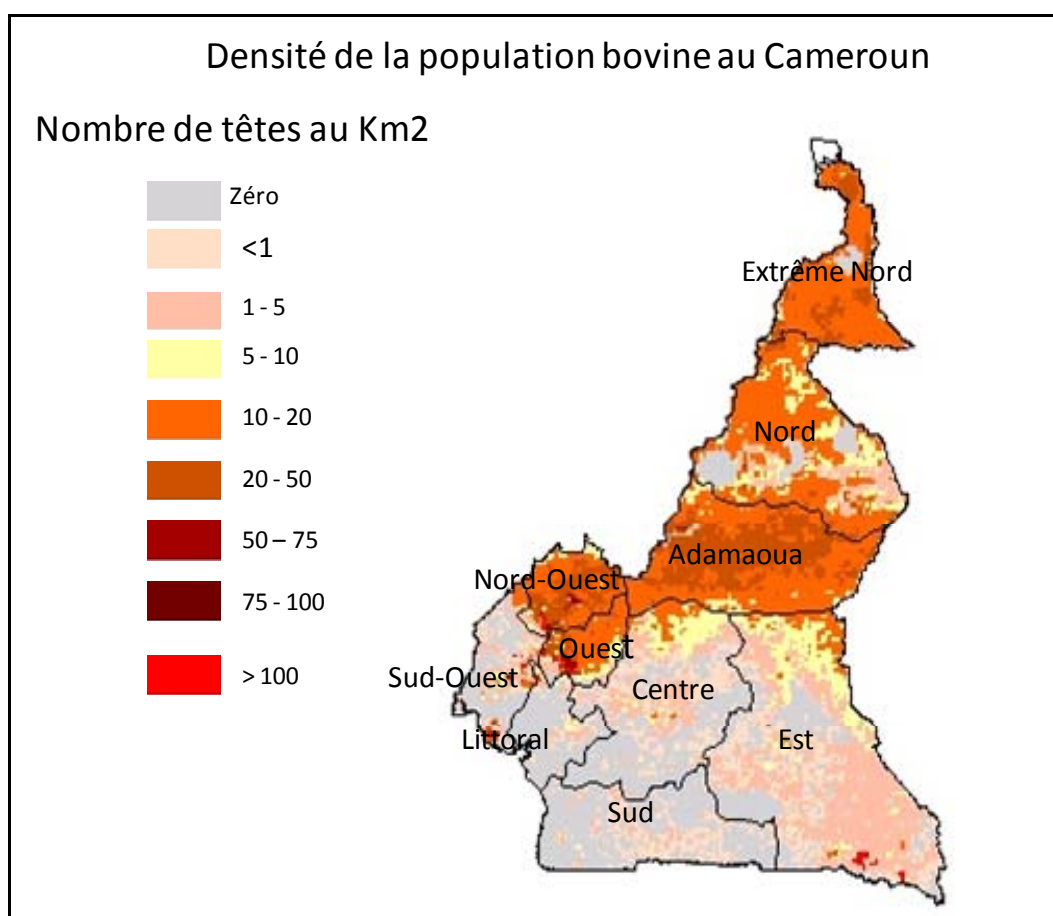


Figure I.3 : carte des densités du cheptel bovin au Cameroun. Les zones d'élevage bovin sont représentées par les régions de l'Adamaoua, du Nord et de l'Extrême-Nord. Les provinces de l'Ouest, de l'Est et du Nord-Ouest sont également des régions d'élevage mais à faible échelle. Source : FAO (www.fao.org).

Le secteur élevage au Cameroun fait face à certains problèmes dont les plus importants sont :

- la longue saison sèche qui entraîne la rareté des pâturages et des points d'eau dans les régions septentrionales ;

- l'extension des surfaces cultivables et des zones cynégétiques au détriment des pâturages (Labonne et al., 2002) ;
- l'infestation par des glossines des régions forestières du sud et des savanes du plateau de l'Adamaoua ;
- les maladies infectieuses dont les plus importantes sont la fièvre aphteuse, la dermatophilose, la maladie nodulaire cutanée, les charbons, les pasteurelloses et la péripneumonie contagieuse bovine.

Les principales causes de mortalité dans les provinces du nord et de l'extrême-nord sont le parasitisme digestif et la malnutrition (Njoya et al., 1995). Le taux de mortalité pouvant atteindre des taux de 7 à 10 % chez les veaux de moins d'un an (Planchenault D., 1992).

I.2.2.2. Situation de la péripneumonie contagieuse bovine au Cameroun

La situation de la péripneumonie contagieuse bovine au Cameroun n'est pas bien connue, aucune enquête n'ayant été menée à l'échelle nationale. Les informations disponibles découlent des déclarations effectuées par les agents du programme PACE (Programme Panafricain de Contrôle des Epizooties) durant la période d'exécution de ce projet qui a démarré au Cameroun en 2004.

De 2005 à 2007, des suspicions de foyers PPCB ont été faites dans les régions du Nord, de l'Adamaoua, de l'Extrême-nord, du Nord-ouest, de l'Ouest et du Sud-ouest (tableau I.2 et figure I.4).

Les suspicions de foyers répertoriées dans le tableau I.2 ont été effectuées dans le cadre du réseau d'épidémiologie-surveillance du PACE dont l'objectif premier était l'obtention du statut de pays indemne de peste bovine. Six maladies prioritaires faisaient l'objet de surveillance : la peste bovine, la péripneumonie contagieuse bovine, la fièvre aphteuse, la peste des petits ruminants, la peste porcine africaine et la maladie de Newcastle et depuis 2006, la grippe aviaire s'est ajoutée à cette liste. Ces suspicions, basées sur des symptômes et quelquefois des lésions, ont été effectuées dans la province du Nord et ensuite dans la province de l'Extrême-Nord. Malheureusement, elles n'ont pas toutes fait l'objet des prélèvements. Il faut noter que certaines suspicions ont été déclarées dans l'Adamaoua, bien que cette zone soit supposée indemne de PPCB.

Régions	Départements	Localités	Date d'apparition	Nombre de foyers
Adamaoua	Djérem	Ngaoundal	juil-06	1
Adamaoua	Faro-et-Déou	Tignère	juin-06	1
Extrême Nord	Mayo Kani	Moutourwa	août-06	1
Extrême Nord	Mayo Tsanaga	Mokolo	août-06	1
Extrême Nord	Mayo Tsanaga	Mogodé	juil-06	1
Extrême Nord	Mayo Kani	Porhi	mars-06	2
Nord	Mayo Louti	Guider	nov-06	1
Nord	Bénoué	Demsa	août-06	1
Nord	Bénoué	Poli	juil-06	1
Nord	Mayo Rey	Touboro	janv-06	2
Nord	Bénoué	Gashiga Ouro Bamanga	nov-05	1
Nord	Bénoué	Garoua Marouaré	nov-05	1
Nord	Bénoué	Badjouma Radier	nov-05	1
Nord	Bénoué	Pitoa Bouli	oct-05	1
Nord	Mayo Louti	Lam Lam	oct-05	1
Nord	Bénoué	Baila Mbor	sept-05	1
Nord	Bénoué	Ngong Djalingo	sept-05	1
Nord	Bénoué	Douloumi	août-05	1
Nord	Mayo Louti	Guider Ouro Dara	août-05	1
Nord	Bénoué	Pitoa Mayo Hobaye	juil-05	1
Nord	Bénoué	Adoumri Houla Kola Bela	avr-05	1
Nord	Bénoué	Garoua Marouaré	févr-05	1
Nord	Bénoué	Adoumri Houla	janv-05	1
Sud-ouest	Meme	Konye	juil-06	1
Sud-ouest	Manyu	Manfé	mai-06	3
Nord-ouest	Donga Mantung	Nkambé	mars-06	1
Ouest	Bamboutos	Babadjou	mars-06	1

Tableau I.2 : liste des suspicions de foyers de PPCB déclarés aux services vétérinaires de 2005 à 2007.

Ces déclarations ont été effectuées dans le cadre du réseau de surveillance PACE-Cameroun (PACE-Cameroun, 2006). Toutes les suspicions n'ont pas été suivies par des analyses de laboratoire.

Les disparités entre les régions pourraient s'expliquer :

- Par la proximité ou non du laboratoire : les personnels des services vétérinaires du Nord sont à proximité du LANAVET et peuvent envoyer plus facilement les prélèvements que leurs collègues plus éloignés (Nord-Ouest, Ouest, Est et quelques départements de l'Adamaoua) ;

- L'équipe mobile n°1 du PACE est basée au laboratoire à Garoua (LANAVET). Elle a plus de facilités pour se rendre sur le terrain effectuer des prélèvements ;
- Par des difficultés des voies de communication entre le nord et le sud ; les avions sont irréguliers et il faut plusieurs jours pour rallier le nord au sud par la voie routière.
- Par la connaissance de la PPCB : au nord et à l'extrême nord, la maladie est bien connue des techniciens des services vétérinaires et des éleveurs. Ce n'est pas le cas dans l'Adamaoua où elle n'a pas été signalée depuis des décennies ;
- Le réseau d'épidémiologie-surveillance a démarré en fin 2004. Les personnels affectés à la surveillance n'ont pas tous intégré en même temps la nécessité de signaler toute suspicion et d'effectuer des prélèvements pour une confirmation par un laboratoire.

L'Adamaoua, principale région d'élevage du Cameroun est considérée officiellement comme indemne de PPCB. Toutefois, ces dernières années, des suspicions ont été effectuées à Tignère, Tibati et Ngaoundal mais sans confirmation du laboratoire. Il est vrai que malgré la levée de la barrière sanitaire de Mbé, les animaux du Nord (région infectée) ne se rendent pas sur le plateau de l'Adamaoua et il n'existe pas de mouvements de bétail des provinces de l'Ouest et du Nord-Ouest vers l'Adamaoua. Au niveau des frontières centrafricaine et nigérienne, il n'existe pas de poste de quarantaine. Le risque d'introduction de la maladie de ce côté n'est pas écarté. Une enquête devrait être menée dans les abattoirs des villes de cette région et dans les élevages afin de déterminer avec certitude le statut de l'Adamaoua vis-à-vis de la péripneumonie contagieuse bovine.

I.2.2.3. Moyens de lutte mis en place au Cameroun et leurs limites.

La lutte contre les maladies animales réputées légalement contagieuses est régie par la loi n° 006 du 16 avril 2001 (voir annexe). Elle prescrit dans le cas de la péripneumonie contagieuse bovine, les mesures suivantes :

- La promulgation d'un arrêté portant déclaration d'infection ;
- le cantonnement des animaux dans une zone bien définie ;
- le marquage au feu à la joue droite de la lettre P, le traitement des animaux et leur abattage pour la boucherie dans un délai maximum de 60 jours ;
- la vaccination des animaux non malades dans toute la zone déclarée infectée ;
- la suspension des foires.

Le stamping-out est une option et non une obligation. Son application se heurte à la faiblesse des moyens dont disposent les services vétérinaires et la plupart des éleveurs, sachant qu'ils risquent la saisie ou l'abattage des animaux, évitent de déclarer des cas de PPCB aux services compétents. La lutte fait donc plus appel à la vaccination avec le vaccin T1-SR produit à Garoua au LANAVET.

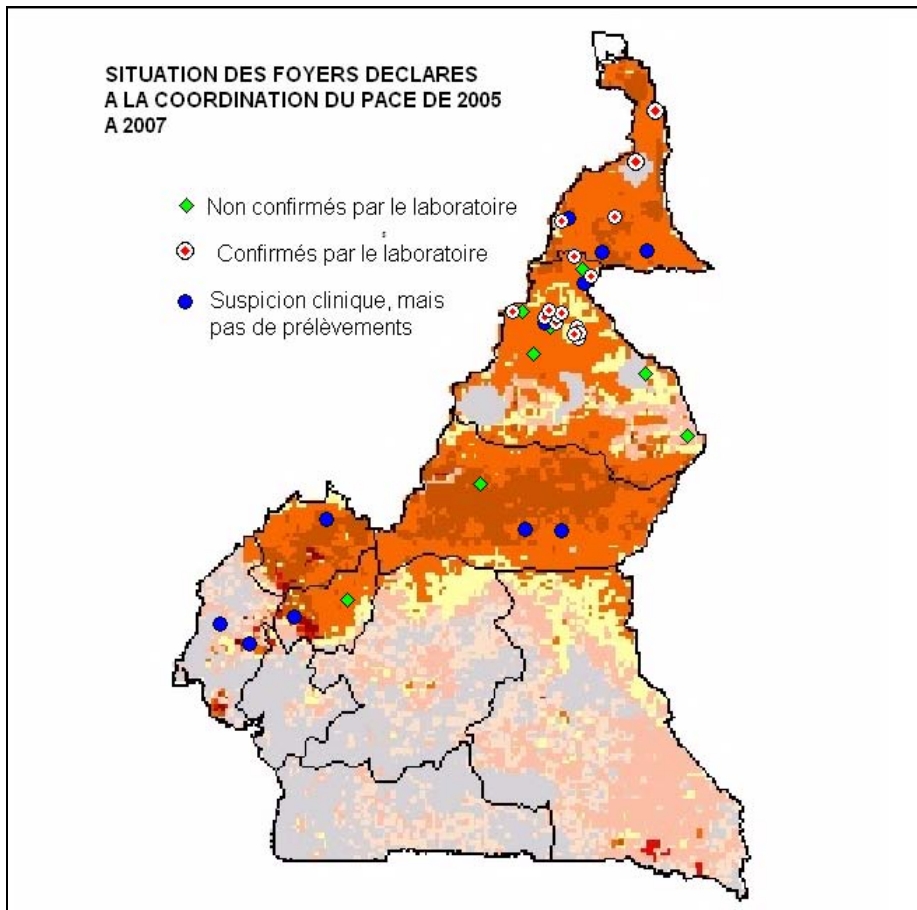


Figure I.4 : carte de localisation des foyers suspects de PPCB déclarés à la coordination nationale du PACE.

Carte établie à partir des déclarations rapportées à la coordination nationale du PACE. Certains foyers ont été confirmés par le diagnostic de laboratoire. Une suspicion et une déclaration à la coordination du PACE ne débouchent pas obligatoirement à l'envoi des prélèvements au laboratoire. La majorité des foyers est située dans les régions du nord et de l'extrême nord.

La loi n° 006 du 16 avril 2000 stipule en son article 19 « La vaccination ou le traitement contre les maladies réputées légalement contagieuses est obligatoire sur toute l'étendue de la république du Cameroun. Les conditions de paiement des taxes de service sont fixées par des textes particuliers ». La vaccination est à la charge des éleveurs qui en supportent

les frais. Ceux-ci varient de 150 à 200 FCFA par tête. Le paiement de ces frais expliquerait la faible couverture vaccinale : les éleveurs présentent une partie de leurs troupeaux à la vaccination pour payer moins de frais. Notons aussi que les campagnes de vaccination ne sont pas organisées au niveau national mais à l'échelle régionale où chaque responsable local des services vétérinaires (délégué provincial, délégué départemental, délégué d'arrondissement ou chef de centre zootechnique et vétérinaire) s'organise comme il peut, (commande des vaccins, organisation de la logistique) pour assurer les séances de vaccination. La loi sur l'exercice de la profession vétérinaire a prévu l'octroi des mandats sanitaires aux vétérinaires en clientèle privée pour leur permettre d'assurer les opérations de vaccination sous la supervision des services de l'Etat. En attendant la promulgation des textes d'application, les services publics continuent les opérations de prophylaxie.

En 1987-88, les foyers de Ndao et de Touroua (LANAVET, 1989) dans la province du Nord ont été éteints par l'utilisation de deux souches vaccinales T1-44 et T2 (Mycovax produit au LANAVET) : la vaccination des animaux dans le foyer avec la souche T2 (qui possède un pouvoir pathogène résiduel non négligeable) a entraîné une exacerbation des symptômes respiratoires et le phénomène de Willems entraînant la mortalité de certains sujets. Tout autour des foyers, les animaux ont été vaccinés avec la souche T-SR. Et les foyers ont été circonscrits. Tout récemment dans la même région, les mesures prises ont consisté à (PACE-Cameroun, 2007) :

- « Identifier tous les foyers (recensement des élevages touchés ou exposés au risque) ;
- Vacciner en anneau autour du foyer ;
- Traiter les animaux contaminés à l'oxytétracycline 20 % et à les marquer sur la joue de la lettre P ».

Ces mesures insuffisantes n'ont pas empêché l'éclatement des foyers secondaires quelques mois plus tard. Certes, les abattages sanitaires étaient difficilement envisageables, faute de pouvoir indemniser les éleveurs. Il aurait fallu un arrêté qui réglemente les mouvements des animaux dans la zone infectée afin d'éviter que les troupeaux suspects se retrouvent sur les mêmes pâturages et les mêmes points d'eau que ceux qui sont supposés indemnes.

En 1983/84, année où l'Adamaoua enregistra ses derniers foyers de peste bovine, 1 034 365 têtes de bovins ont été vaccinés au Bivax (vaccin mixte peste bovine-

péripleurmonie) (MINEPIA Nord, 1984). Douze ans plus tard (1995/96), le LANAVET, seul laboratoire fournisseur de vaccins pour ruminants au Cameroun, n'aura vendu que 1174500 doses de vaccins anti-péripleurmoniques à l'intérieur du pays. Cela nous donne une estimation de la couverture vaccinale de l'ordre de 19 % (sur un cheptel de plus de six millions de têtes selon les estimations du ministère de l'élevage) et montre clairement que les prescriptions légales ne sont pas respectées. D'un point de vue plus opérationnel une bonne protection ne peut être conférée par la vaccination que si celle-ci est répétée régulièrement. De plus l'immunité conférée par le vaccin T1-SR n'est que de 6 mois (au contraire du vaccin anti-bovine pestique qui confère une protection à vie et du vaccin T1/44 dont la durée de protection est estimée à un an). Dans ces conditions, il est peu probable que les campagnes de vaccination actuelles contre la PPCB aient un impact déterminant.

En 1986/87, lors du dernier foyer de peste bovine à Mindif (province de l'Extrême-Nord), 447123 têtes de bovins ont été présentées à la vaccination contre 236206 têtes l'année précédente (MINEPIA Nord, 1987). La peur de la peste bovine avait fait doubler le nombre d'animaux présentés à la vaccination dans la région (une hausse de couverture vaccinale de plus de 189 %). Actuellement, la peur de la peste bovine n'existant plus et la gravité de la PPCB n'étant pas perçue par tous les éleveurs, le taux de couverture vaccinale continue de baisser et les prescriptions légales ne sont pas appliquées.

I.3. *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC : CLASSIFICATION, GENOME, IDENTIFICATION

I.3.1. Classification

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des Mollicutes, bactéries sans paroi. A la différence des formes L, ils n'ont pas d'information génétique pouvant conduire à la synthèse de la paroi. La classe *Mollicutes* comprend quatre ordres (Edward et Freundt, 1956 ; Razin et al., 1998) : *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*. L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend une seule famille, la famille des *Mycoplasmataceae* divisée en deux genres : *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Le genre *Mycoplasma*, avec une centaine d'espèces répertoriées, est le plus important en pathologie animale. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC a été le premier mycoplasme isolé par Nocard et Roux en 1898 (Nocard et Roux, 1898). D'après des études de phylogénie basées sur les séquences d'ARN 16S (figure I.6), MmmSC fait partie du groupe des *Spiroplasma*

(des Mollicutes isolés des plantes et des insectes). A l'intérieur du grand groupe de Spiroplasma, il fait partie du groupe mycoides (en anglais « mycoides cluster »), un ensemble de six espèces, sous-espèces ou souches de mycoplasmes pathogènes des ruminants (tableau I.3) et présentant des similitudes sur le plan biochimique, antigénique et génétique (Weisburg et al. 1989; Pettersson et al.. 1996; Johansson et al. 1998). Ces similitudes rendent leur classification et leur identification plus difficiles.

Espèces ou sous-espèces	Hôte principal (hôtes secondaires)	Maladie ou syndrome	Souches de référence
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Bovin	PPCB	PG1
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Caprin (ovin, bovin)	MAKEePS	Y-goat
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	Caprin	PPCC	F38
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	Caprin (ovin)	MAKEePS	Calif kid
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Caprin	MAKEePS	PG3
M. sp groupe 7 de Leach	Bovin	MAKEePS	PG50

Tableau I.3 : les mycoplasmes du groupe « mycoides » (d'après Cottew, 1987). Le groupe « mycoides » est composé de six espèces, sous-espèces ou souches pathogènes des ruminants. MAKEePS : Mammite, arthrites, kératite, pneumonie et septicémie, PPCC : pleuropneumonie contagieuse caprine.

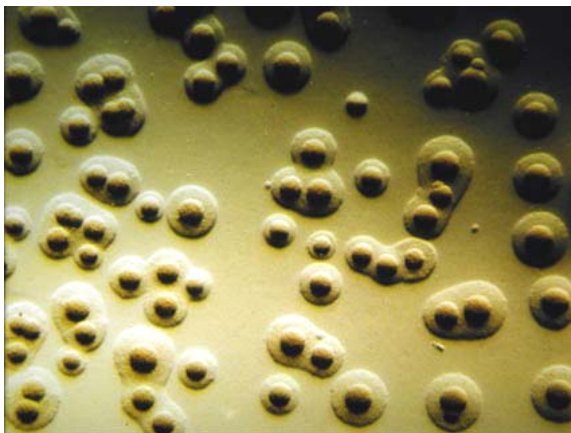


Figure I.5: colonies de mycoplasmes sur un milieu gélosé. Les colonies de mycoplasmes (0.1 à 1mm) ont un aspect caractéristique qualifié d'œuf sur le plat. Elles s'incrustent dans la gélose par leur centre (Photo : F. Thiaucourt)

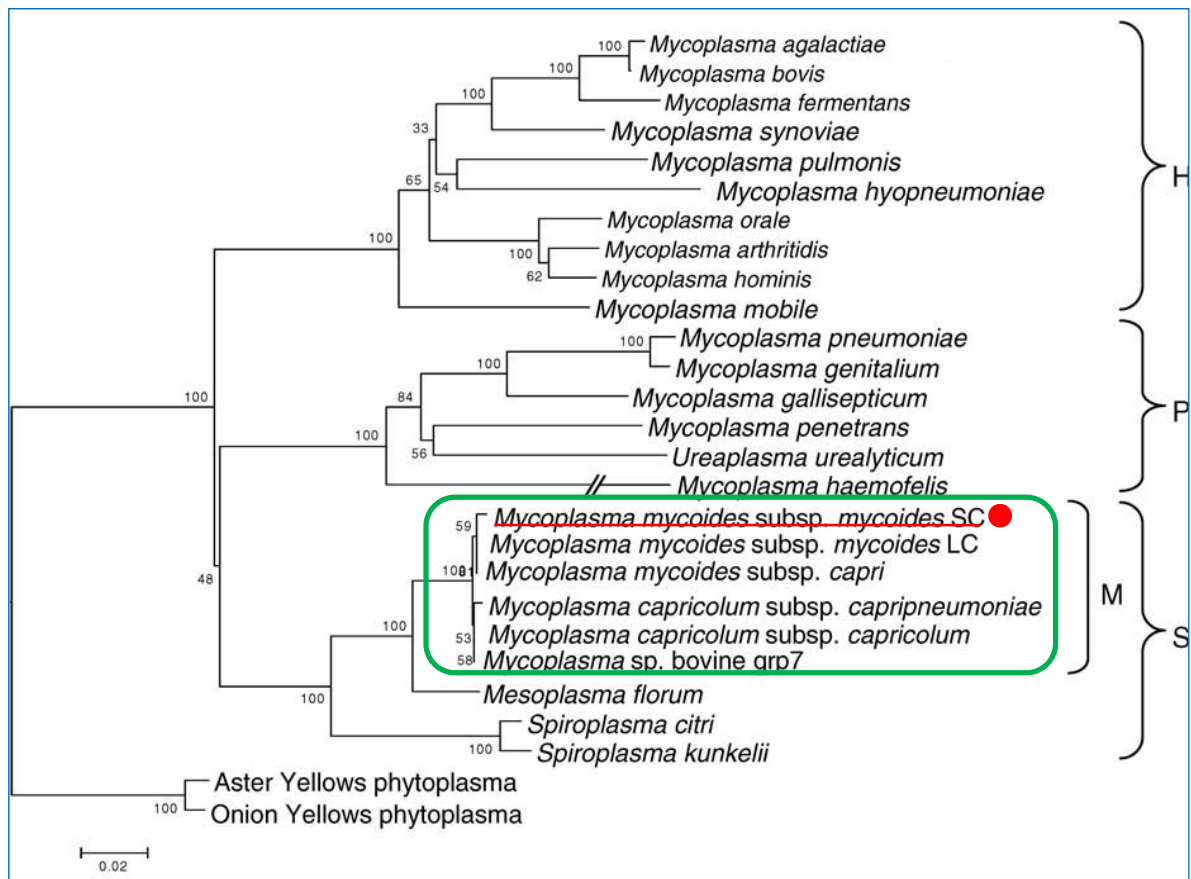


Figure I.6 : arbre phylogénique des souches de mycoplasmes sur la base des séquences ARN16S. *Mycoplasma mycooides* subsp. *mycooides* SC (souligné en rouge) fait partie du groupe des Spiroplasma (S), mollicutes pathogènes des insectes et des plantes et du sous-groupe « mycoïdes » (M). Les valeurs statistiques de bootstrap, soutenant les différents embranchements, sont indiquées par les chiffres arabes. Les groupes phylogénétiques Spiroplasma, Pneumoniae et Hominis sont indiqués respectivement par des lettres S, P et H. M : groupe mycoïdes. Source : Sirand-Pugnet, 2007).

Des études réalisées sur des profils protéiques par SDS-PAGE (Costas et al., 1987 ; Leach et al., 1989 ; Olsson et al., 1990 ; Rodwel, 1982), par hybridation ADN-ADN (Taylor, 1992 ; Monnerat et al. 1999), sur les gènes ARN 16S (Pettersson, 1996), sur le gène LppA (Monnerat et al., 1999), sur le gène d'une protéine membranaire (Thiaucourt et al., 2000), sur le gène *rpoB* (Vilei E. M., 2006) ont toutes montré qu'il n'était pas possible de distinguer les souches de *M. mycooides* subsp. *capri* et de celles de *MmmLC*. Par conséquent, elles devraient être regroupées dans un même taxon (*Mycoplasma mycooides* subsp. *capri*). Cette proposition a été confirmée par une étude de phylogénie effectuée sur des séquences concaténées de cinq gènes de ménage *fusA*, *glpQ*, *gyrB*, *lepA* et *rpoB* (Manso-Silvan et al., 2007). A l'intérieur du groupe mycoïdes, une publication récente propose également la dénomination de *Mycoplasma leachii* pour désigner les souches du groupe 7 de Leach (Manso-Silvan et al., 2008). Le groupe mycoïdes serait alors composé

de cinq sous-espèces ou espèces : *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* et *M. leachii*.

I.3.2. le génome de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC.

Le génome de la souche de référence internationale PG1^T a été entièrement séquencé. Il comprend 1211703 paires de bases, une composition en GC de 24 % et environ 985 gènes putatifs (Westberg, 2004). Le génome de PG1 possède de nombreuses séquences répétées (jusqu'à 29 % du génome) dont les plus longs ont 24, 13 et 12 kpb.

Les séquences d'insertion (IS) sont des segments d'ADN de taille inférieure à 2.5 kb, capables de s'insérer sur des sites multiples d'un génome de procaryote (éléments transposables). Leur organisation est simple. Elles codent en général pour une seule protéine nécessaire à leur transposition (Mahillon et al., 1998). Plus de 1500 IS différentes ont été identifiées. MmmSC possède trois types de séquences d'insertion qui occupent plus de 13 % du génome. C'est le micro-organisme le plus dense en séquences d'insertion (Westberg et al., 2004). Dans le groupe mycoides, quatre types d'IS ont été décrits :

- IS 1296 (Frey, 1995) est longue de 1485 pb et présente en 28 copies dans le génome de PG1. Cette IS est également présente en 5 copies chez des souches de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC), 2 copies chez les souches du groupe 7 de Leach et absente des autres membres du « groupe mycoides ». Elle possède une séquence inversée répétée de 30 pb, 2 phases ouvertes de lecture ORF A et ORF B homologues aux ORFs codant pour une transposase.
- L'IS1634 (Vilei, 1999) est constituée de 1872 pb et présente en 60 copies dans le génome de PG1. Elle possède deux séquences terminales de 13 pb inversées répétées, un cadre ouvert de lecture codant pour un produit de 533 acides aminés homologue à la transposase IS1549 de *Mycobacterium smegmatis* (famille IS4). Cette IS n'a pas été identifiée parmi les autres membres du groupe mycoides. Elle possède une forte homologie (97 %) avec la séquence d'insertion ISMbov3 de *Mycoplasma bovis*. Ce qui résulterait d'un transfert horizontal de ces éléments lors d'une co-infection par *Mycoplasma bovis* et MmmSC d'un même hôte (Thomas et al., 2005).

- ISMmy1, constituée de 1670 pb, est présente en 8 copies et une copie tronquée dans le génome de la souche de référence PG1. Cette IS est aussi présente dans le génome de *Mycoplasma bovis*, pathogène de l'appareil respiratoire des bovins, présence qui résulterait d'un transfert horizontal de gènes entre *M. bovis* et MmmSC (Westberg, 2002).
- ISMmy2 (Thiaucourt, soumis à ISFinder <http://www-is.biotoul.fr/>) est constituée de 1374 pb. Une copie dégradée de cette IS existe dans le génome de PG1. Cette IS présente en six copies chez MmmLC, a été également identifiée chez certaines souches de *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. yeatsi* et *M. cottewii*.

I.3.3. Identification de MmmSC au laboratoire.

Au laboratoire, l'identification traditionnelle de MmmSC nécessite des isolements sur des milieux complexes suivis de clonage, des tests biochimiques et l'identification par un sérum hyper-immun (inhibition de croissance ou immunofluorescence). MmmSC forme sur gélose, des colonies de petite taille (de 0,1 à 1 mm de diamètre) incrustées par leur centre dans la gélose (photo n° I.2), une légère turbidité en bouillon avec formation des comètes, contrairement à MmmLC. Cette dernière donne des colonies plus larges, une plus grande turbidité en bouillon et digère le sérum coagulé ou la caséine (Cottew et Yeats, 1978). Sur le plan sérologique, en inhibition de croissance ou en immunofluorescence, ces deux biotypes sont indissociables (Pettersson, 1996).

Tests biochimiques	Résultats
Présence de film et spot	-
Fermentation du glucose	+
Réduction des sels de tétrazolium	+ Aérobie et anaérobie
Hydrolyse de l'arginine	-
Activité phosphatasique	-
Pouvoir protéolytique	- ou faible

Tableau I.4 : caractères biochimiques de MmmSC (Provost et al., 1987).

+ : positif, - : négatif

Depuis 1994, il existe des techniques d'identification rapide de MmmSC. Il s'agit tout d'abord d'une technique de dot blot utilisant l'anticorps monoclonal spécifique de

MmmSC qui est utilisé dans le test ELISA de compétition (Le Goff et Thiaucourt, 1999). Il s'agit ensuite des tests de polymérisation en chaîne. Les premiers tests spécifiques de MmmSC sont apparus en 1994 (Bashiruddin et al., 1994 ; Dedieu et al., 1994) mais d'autres ont suivi ensuite (Hotzel et al., 1996 ; Miserez et al., 1997). L'avènement de la technique de PCR en temps réel a ensuite permis d'obtenir des techniques tout aussi spécifiques mais encore plus sensibles permettant de détecter environ 3 à 10 UFC par échantillon testé (Gorton et al., 2005 ; Fitzmaurice et al., 2008 ; Lorenzon et al., 2008).

I.4 TYPAGE DES SOUCHES DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC.

Dans la lutte contre les maladies infectieuses et aussi pour une meilleure compréhension du mécanisme de leur transmission, il est important de pouvoir déterminer l'origine des foyers. Pour cela, il faut utiliser des techniques de typages qui permettent ensuite d'obtenir des corrélations avec l'origine géographique ou l'hôte animal pour celles qui affectent plusieurs espèces. Cette détermination est encore plus importante lorsqu'on s'achemine vers l'éradication de la maladie : tout nouveau cas doit faire l'objet d'une enquête pour déterminer s'il s'agit d'une nouvelle infection ou de la résurgence lié à des foyers anciens. Cela démontre l'importance du typage des souches microbiennes. Pour le cas de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, le premier typage a été un biotypage qui a défini le biotype SC responsable de la PPCB et le biotype LC (Cottew and Yeats, 1978) qui provoque le syndrome MAKEPS (mammite, arthrites, kératite, pneumonie et septicémie) chez les ovins et caprins.

Pendant longtemps, les souches de MmmSC ont été considérées comme étant relativement homogènes contrairement aux souches de MmmLC (Costas et al, 1987). En effet un seul sérum hyperimmun peut inhiber toutes les souches de MmmSC, y compris les souches vaccinales, et les profils protéiques observés par la technique de SDS-PAGE sont quasiment identiques quelles que soient les souches de MmmSC. Ce n'est pas le cas avec les souches de MmmLC. Les variations entre les souches de MmmSC ont été observées à la faveur du développement d'outils plus précis. C'est ainsi qu'en 1997, Houshaymi et coll. (Houshaymi et al., 1997) ont montré que l'oxydation du glycérol permettait une différenciation des souches d'origine africaine ou australienne (qui métabolisent le glycérol) de celles d'origine européenne qui n'en oxydent pas ou très peu. Depuis, d'autres techniques ont été utilisées avec succès.

I.4.1. Typage basé sur les profils de restriction d'ADN

Avec l'analyse des fragments de restriction d'ADN total, et immunoblotting, Poumarat et Solsona (1995) ont comparé les souches d'origine africaine et européenne. Dans cette étude, le profil de la plupart des souches africaines différait de celles d'origine européenne. Les auteurs ont noté le profil particulier des souches vaccinales (T1-44 et KH3J). Les souches d'origine européenne se répartissaient dans deux groupes, un groupe majoritaire (13/16) qui ne comprenait que des souches européennes alors que trois autres souches (originaires d'Espagne et du Portugal) étaient dans un groupe en « coexistence » avec des souches d'origine africaine. Il n'y avait donc pas de lien strict entre le type de restriction et l'origine géographique.

La digestion enzymatique (*SpeI*) d'un fragment d'ADN obtenu par PCR (PCR-REA) sur le gène *bgl* a permis de ségréger les souches de MmmSC testées en deux groupes : un premier groupe (souches dont le fragment amplifié possède un site de coupure *SpeI*) ne comprend que des souches d'origine africaine alors que le second groupe (sans site de coupure) associe des souches d'origines variées (Europe y compris la souche PO67, Australie et l'Afrique (souches T1-44 et T1-SR). Dans ce typage, la souche PG1 dont l'origine est inconnue appartiendrait au second groupe. Ce qui la rapprocherait des souches européennes car celles-ci sont majoritaires dans ce groupe (Vilei et Frey, 2004). De même, la souche PO67 a bien le même type que les autres souches d'origine européenne.

I.4.2. Typage basé sur des séquences d'insertion (IS1664, IS1296, ISMmy1) par « Southern Blotting »

Le nombre et la position des séquences d'insertion varient d'une souche à une autre et cette variabilité a été utilisée pour un typage des souches de MmmSC. L'IS1296 a été utilisée comme sonde nucléique et hybridée par la technique de Southern, sur l'ADN génomique digéré par *Hind III*. 10 profils différents ont été obtenus à partir de 63 souches d'origines géographiques variées. Cette étude a montré une certaine hétérogénéité des souches africaines. Les souches vaccinales possédaient un profil particulier qui les distinguait des autres souches (Frey et al., 1995 ; Cheng et al., 1995). Avec l'IS1634 comme sonde nucléique, cinq groupes ont été observés sur un échantillon de 22 souches. Toutes les souches européennes possédaient une bande de 7 kb qui les différenciait des souches africaines et australiennes et les isolats d'une même région avaient souvent le même profil

(Vilei et al., 1999). Les souches vaccinales (T1SR, T1-44 et KH3J) appartiennent au même groupe. Cependant, l'utilisation de cette sonde se heurte au problème du grand nombre de copies ou des copies partielles qui rend difficile l'interprétation des profils. Les souches analysées avec la sonde ISMmy1 ont présenté pour la plupart des bandes similaires montrant une faible variabilité (Westberg et al., 2002). Cette séquence d'insertion semblait donc peu utile comme outil de typage d'après les auteurs.

I.4.3. Typage par amplification des fragments de restriction (AFLP)

La technique AFLP développée par l'équipe de Vos (Vos et al., 1995) a été appliquée avec succès sur les espèces de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyosynoviae* et *Mycoplasma dispar* (Kotokovic, 1999). La technique consiste d'abord à digérer de l'ADN génomique par deux enzymes de restriction générant des extrémités cohésives et ensuite à effectuer une ligation avec des adaptateurs. Les fragments de restriction sont alors amplifiés avec des amorces correspondant aux adaptateurs mais légèrement modifiés. La modification consiste à ajouter en 3' de l'adaptateur une ou plusieurs bases afin de n'amplifier que les fragments d'ADN se terminant par cette base. Le nombre et la nature des bases ajoutées permet de rendre la technique plus ou moins stringente. En marquant l'une des amorces avec un composé fluorescent, on peut alors détecter les fragments amplifiés à l'aide d'un séquenceur (Kotokovic, 1999) et la finesse de résolution des bandes est de l'ordre d'une base. L'intérêt de cette technique est qu'elle ne dépend pas d'une connaissance préalable du génome, que les fragments amplifiés sont a priori répartis sur tout le génome et que de nombreuses bandes peuvent être détectées (jusqu'à 300). Ce qui augmente les chances d'observer des différences d'une souche à l'autre. Cette technique s'applique bien au typage des souches de MmmSC. En l'utilisant, Kusiluka a analysé des variations au niveau des sites de restriction de *Bam*HI et *Csp*6I des souches de Tanzanie, Kenya, Portugal et Botswana. Six profils AFLP différents ont été identifiés et les souches provenant des pays différents avaient des profils différents (Kusiluka; 2001). Cependant, cette méthode n'a pu établir de différences entre la souche vaccinale T1-SR et la souche de référence PG1. Ce qui montre les limites de son pouvoir discriminant, en tout cas avec les enzymes choisies.

I.4.4. Typage par la technique d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

La technique consiste à digérer l'ADN génomique d'une bactérie avec des enzymes ne coupant que très peu fréquemment le génome en question. Les fragments de grande taille obtenus sont alors séparés dans un gel d'agarose de faible pourcentage et la migration se réalise en alternant des champs électriques perpendiculaires pour favoriser le passage à travers les pores du gel. Il est ainsi possible de distinguer les souches à partir du nombre de fragments obtenus ou de leur taille. Le pouvoir discriminant de la technique en fonction du nombre de fragments est assez faible puisqu'il y en a très peu (de 6 à 15 environ). Par contre, cette technique permet d'identifier des événements comme des délétions ou insertions de fragments d'ADN de grande taille ou bien des inversions. Sans doute, elle ne permet pas de distinguer des souches qui ne diffèrent que d'une copie d'IS car le changement de taille sera inférieur au pouvoir résolutif de la technique. Avec l'enzyme *BamHI*, Kusiluka a identifié six profils PFGE parmi un échantillon de 62 souches (Kusiluka, 2001).

I.4.5. Typage par MLSA (Multilocus sequence analysis).

La technique MLST (Multilocus Sequence Typing) a été décrite par Maiden sur *Neisseria meningitidis* (Maiden et al., 1998) et porte sur l'analyse de polymorphisme sur des gènes de ménage. Avec MmmSC, il existe très peu de variabilité au niveau des gènes de ménage. La technique MLSA (Multilocus Sequence Analysis) développée par la suite est basée sur des séquences non codantes (Lorenzon et al., 2003). Son pouvoir discriminant est supérieur à celui des autres outils de caractérisation des souches. Dans un échantillon de 48 souches, 15 profils différents ont été obtenus et la différence entre les souches d'Europe et d'Afrique observées avec d'autres outils de typage, a été confirmée et a même permis une distinction de différents groupes parmi les souches d'origine africaine (groupe D en Afrique australe, groupe B en Afrique de l'Ouest). Cet outil de typage a permis également la distinction à l'intérieur des souches européennes qui se répartissent en trois groupes. L'application d'une partie de cet outil de typage (la PCR permettant de détecter la délétion caractéristique des souches européennes isolées après 1980) a permis à Li (Li et al., 2007) de montrer que les souches isolées en Chine entre 1953 et 1960 ne possédaient pas cette délétion.

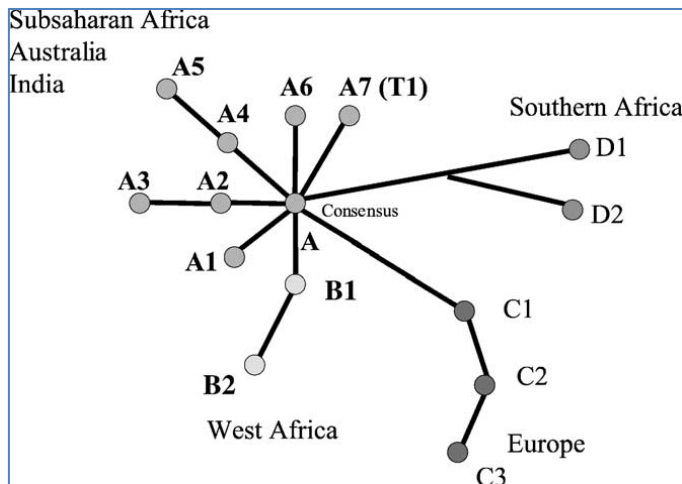


Figure I.7 : groupes et profils alléliques obtenus avec le 1^{er} système MLSA (Lorenzon et al., 2003). Les souches européennes appartiennent toutes au profil C, les souches d’Afrique de l’Ouest au groupe B et les souches d’Afrique subsaharienne, d’Australie et d’Inde au groupe A.

I.4.6. Typage par MLVA (Multilocus Variable Number Tandem-Repeats analysis)

La publication de la séquence de PG1 a permis le développement d’autres outils de typage. La technique de MLVA (Variable Number Tandem Repeats analysis) est basée sur le polymorphisme du nombre de séquences courtes répétées en tandem. Elle avait été appliquée sur d’autres germes bactériens tels *Clostridium* (Sawires et Songer, 2005) ; *Neisseria meningitidis* (Killoran et al, 2006), *Staphylococcus aureus* (Gilbert et al, 2006) ou *Bacillus anthracis* (Lista et al. 2006). A l’INRA de Bordeaux, sur 42 séquences répétées en tandem sélectionnées, trois (TR34, TR39 et TRFT1) avaient une variabilité utile au typage des souches MmmSC. En combinant ces trois marqueurs, 17 profils alléliques ont été obtenus (Janis C., 2006). McAuliffe et al., de leur côté, ont analysé 39 souches de MmmSC et identifié 12 profils alléliques différents (McAuliffe et al., 2007) faisant du MLVA, un outil potentiel pour le typage des souches. Contrairement aux autres outils de typage, le MLVA ne nécessite pas d’équipement lourd pour sa mise en œuvre. Un thermocycleur et le nécessaire pour électrophorèse suffisent.

I.5. POUVOIR PATHOGENE DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC.

Le mécanisme du pouvoir pathogène de MmmSC n’est pas très bien élucidé. Plusieurs tentatives d’explication ont été formulées. Les facteurs classiques de virulence tels que les toxines, les invasines n’ont pas été identifiés pour expliquer pourquoi certaines souches sont plus pathogènes que d’autres.

Le galactane est un polymère du galacto-furannose qui serait à l'origine d'un phénomène d'auto immunité. Des complexes immuns provoqueraient une réaction de type phénomène d'Arthus entraînant une thrombose des vaisseaux lymphatiques et sanguins, un œdème et une infiltration des lobules pulmonaires affectés (Orue, 1961). Le degré de virulence serait lié à la quantité de galactane produite et l'inoculation de galactane en même temps qu'une culture augmenterait la virulence (Cottew, 1979). L'administration du galactane par voie intraveineuse est suivie de symptômes et lésions au niveau des poumons (Buttery et al., 1976). Provost (Provost, 1987) a expliqué une partie du pouvoir pathogène par une réaction d'hypersensibilité de type réaction d'Arthus au niveau des nœuds lymphatiques et selon lui, l'héparine jouerait un rôle protecteur contre MmmSC.

Vilei et Frey (2001) ont montré le rôle que pourrait jouer le système de transport du glycérol. En effet, les gènes qui interviennent dans le transport du glycérol (*gtsA*, *gtsB* et *gtsC*) sont présents et exprimés dans les souches d'origine africaine et australienne et l'eau oxygénée (H_2O_2), produit du métabolisme du glycérol, est plus importante pour ces souches là. En revanche, les souches d'origine européenne peu ou non pathogènes ne possèdent qu'une partie du gène *gtsC* et le gène *gtsB* fait défaut. L'utilisation des anticorps monoclonaux contre le produit du gène *gtsB* a bien montré son implication dans le transport du glycérol. Les souches d'origine européenne possèdent une délétion de 8,8 kpb de l'opéron *gtsABC* qui code pour le transport du glycérol. Une enzyme, la L-glycérophosphate oxydase (*GlpO*) localisée dans la membrane cytoplasmique est responsable de la production de H_2O_2 en présence du glycérol. Cette enzyme aurait un rôle primaire dans la virulence de MmmSC mais nécessite que l'eau oxygénée produite dans la cellule du mycoplasme soit exportée et qu'il y ait un contact étroit entre le mycoplasme et la cellule (Pilo et al. 2005 ; Bischof et al., 2008). Toutefois, les souches vaccinales T1SR, KH3J produisent de l'eau oxygénée, n'ont pas de délétion de 8.84 kpb de l'opéron *gtsABC* et ne sont pas pathogènes. Ce qui indique que d'autres facteurs interviendraient dans le mécanisme de la virulence de MmmSC.

CONCLUSIONS

La péripneumonie contagieuse bovine est une maladie dont l'importance économique est quelquefois remise en cause, en raison du manque de données fiables de déclaration de la part des pays où elle sévit. Son éradication se heurte à la faiblesse des moyens mis en œuvre dans les pays infectés mais aussi à la méconnaissance de son pouvoir pathogène et

du support de l'immunité, conditions essentielles pour le développement des nouveaux vaccins plus efficaces.

Toutefois, la publication en 2004 de la séquence complète du génome de la souche de référence PG1 a permis le développement de nombreux outils de diagnostic par PCR et de phylogénie. D'autres souches sont en cours de séquençage. La comparaison des génomes complets, ou en tout cas de toutes les séquences codantes, qui ne sont pas répétées pourrait permettre de mesurer le polymorphisme dans ce biotype et ainsi permettre de définir les meilleurs outils de typage moléculaire. C'est ce que nous avons fait à partir des séquences génomiques obtenue à partir d'une souche hautement pathogène originaire du Cameroun et qui ont été comparées à la séquence de la souche de référence PG1.

Par ailleurs il existe maintenant des outils qui permettent de réaliser des études de génomique fonctionnelle chez les mycoplasmes. Cependant l'étude des souches transformées se heurte au manque d'animal de laboratoire qui pourrait permettre de mesurer facilement l'impact réel des transformations sur la virulence des souches. Comme cette virulence est intimement liée à la réaction inflammatoire de l'hôte naturel (les bovins), nous avons envisagé d'utiliser des inoculations par la voie sous-cutanée chez le bovin pour mesurer la virulence des souches.

Ces points font l'objet des chapitres suivants.

CHAPITRE II

TYPAGE MOLECULAIRE DES SOUCHES DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC PAR MLSA (MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS), MLVA (MULTILOCUS VARIABLE NUMBER TANDEM REPEATS ANALYSIS) ET APPLICATION A L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE (PPCB).

II.1 INTRODUCTION.

L'épidémiologie moléculaire est une discipline hybride qui allie des données purement épidémiologiques à des données de typage moléculaire. L'intérêt d'associer ces deux types de données est qu'elles sont de nature complètement différente et qu'elles sont donc complémentaires. L'objectif final est toujours de répondre à une question épidémiologique et, en conséquence, les outils de typage doivent être adaptés au questionnement. En ce qui concerne la lutte contre les maladies animales, un des objectifs prioritaires sera de mieux comprendre les modes de transmission de l'agent pathogène et de pouvoir « pister » sa diffusion dans un territoire. Cette compréhension doit elle-même servir à analyser les facteurs de risque liés à la maladie ciblée, à évaluer l'efficacité ou bien au contraire à comprendre les causes d'échec des stratégies de lutte.

La base du développement de nouveaux outils de typage pour un groupe d'organismes repose essentiellement sur une connaissance de la biodiversité qui existe dans ce groupe, et si possible, sur les mécanismes génomiques qui déterminent cette biodiversité. Dans cette étude nous avons voulu d'abord évaluer le polymorphisme génomique existant entre le génome de la souche de référence (PG1) et les séquences disponibles pour une souche d'origine camerounaise. Pour cette deuxième souche, il s'agissait essentiellement des séquences qui sont en copie unique au sein du génome. Au vu de ces résultats préliminaires, nous avons choisi de développer une technique de type « séquençage multilocus » puisque la majeure partie du polymorphisme consistait en des mutations ou des insertions/délétions ponctuelles. Parmi les sites polymorphes, nous avons ensuite choisi trois types de cibles : certains situés dans des gènes de ménage, d'autres dans des gènes codant pour des antigènes de surface et d'autres enfin dans des zones non codantes. Le

polymorphisme sur ces sites a ensuite été évalué sur 5 souches d'origine diverse. L'objectif était de comparer le polymorphisme existant sur les différents types de cible afin de choisir les plus adaptés à nos objectifs et de pré-valider le système pour voir quels sites présentaient le plus de variabilité sur notre pré-échantillonnage de 5 souches. Une fois les sites (ou locus) choisis, nous avons appliqué le typage à un échantillonnage représentatif de souches au niveau mondial.

Une fois notre étude MLSA validée, nous avons voulu également compléter les résultats en typant le même échantillonnage de souches avec une autre technique basée sur les VNTR. Ces VNTR sont connus dans plusieurs groupes bactériens comme des sites particulièrement polymorphes ayant une « horloge moléculaire » plus rapide que les autres évènements comme par exemple les mutations ponctuelles. L'objectif était alors de voir si ce type de site pouvait convenir pour réaliser des typages sur un échantillonnage global au niveau mondial. En effet, il est connu que des « horloges moléculaires » trop rapides peuvent éventuellement brouiller le signal obtenu avec des temps d'évolution assez long et qu'elles seraient plus adaptées à l'étude d'évènements survenus dans un laps de temps relativement court.

II.2. MATERIELS ET METHODES

II.2.1. Les souches de MmmSC

L'étude a porté sur 51 souches de MmmSC isolées d'Afrique, d'Asie et d'Europe et provenant de la souchothèque du CIRAD-BIOS et des laboratoires collaborateurs. Leurs noms et leurs origines figurent dans le tableau II.1. Elles ont été sélectionnées de façon à couvrir l'ensemble des régions où la PPCB a sévi ou continue de sévir : Afrique (38 souches), Europe (5 souches), Australie (2 souches), Inde (1 souche). Deux souches sont d'origine inconnue (Lederlé et PG1). La plus ancienne souche a été isolée en Australie en 1936 et la plus récente (2004/003) vient de la Zambie isolée en 2004. Deux souches d'origine ovine et caprine ont été incluses (Vom et 99048 respectivement d'origine nigériane et indienne).

Les souches ont été cultivées au laboratoire P3 dans le milieu liquide de Hayflick modifié contenant du glucose (2 g/l) et du pyruvate de sodium (Thiaucourt et Di Maria, 1992). La culture est arrêtée à la fin de la phase exponentielle de croissance. 2 ml de culture sont

centrifugés (13000 g, 10 minutes). Le culot a été repris dans 100 µl d'eau distillée et lysé avec 150 µl de tampon de lyse (100 mM Tris HCl pH 8.5, 0.5% Tween 20, 0.24 mg/ml de protéinase K) à 60°C pendant 30 minutes et ensuite la protéinase K est inactivée à 95°C pendant 5 minutes. Les autres manipulations ont été effectuées au Laboratoire P2. Les échantillons ont été conservés en aliquotes à +4°C et -20°C jusqu'à amplification par PCR. Afin d'évaluer la stabilité de l'ADN dans les lysats de culture et la possibilité d'utiliser ces derniers pour la PCR sans une extraction préalable de l'ADN, chaque échantillon a été aliquoté en deux : une partie gardée à +4°C et l'autre à -20°C. Pour évaluer la robustesse et la stabilité de la méthode, les cultures de la souche 8740 d'origine et cette même souche ayant subi 11 et 53 passages *in vitro* ou bien un passage *in vivo* (8740-Rita) ont été incluses dans le panel des échantillons.

Profils	Souches	origine	Localité	Année d'isolement	Observations
A00	Gemu Gofa	Ethiopie	Turmi ?	1974	
A00	83162	Tchad	Bongor ?	1983	
A01	91130	RCA	Bouar?	1991	
A02	Afadé	Cameroun	Afadé	1965	
A02	Vom	Nigeria	Vom ?	1965	Origine ovine
A03	B17	Tchad	N'Djamena	1959	
A04	8740	Cameroun	Touroua	1987	
A04	98029	Benin	Kandi?	1998	
A04	9048	Niger (Nigeria)	Sokoto ?	1990	
A04	8740/53p	Cameroun		1987	53è passage
A04	8740/11p	Cameroun		1987	11è passage
A04	8740-Rita	Cameroun			Issue de la souche 8740
A05	Muguga	Kenya	Athi-river	1997	
A05	95014	Tanzanie	Shinyanga ?	1995	
A05	94111	Rwanda	Kigali	1994	
A06	2000/033	Ethiopie	Gimbi	2000	
A07	7721	Mauritanie	Tiguent	1997	
A08	96010	Mauritanie	Nouakchott ?	1996	
A09	Fatick	Sénégal	Fatick	1968	

Tableau II.1 : liste des souches utilisées et leur origine (1^{ère} partie).

Profils	Souches	Origine	Localité	Années d'isolement	Observations
A10	99042	Mali	Kolokani ?	1999	
A11	2000/005	Burkina Faso	Ouagadougou?	2000	
A12	2003/036	Mali	Ségou ?	2001	
A12	87137/10	Burkina Faso	Banfora	1987	
A12	98011	Côte d'Ivoire	?	1998	
A13	9050	Côte d'Ivoire	Korhogo ?	1990	
B01	C8988	Namibie	Oudangwa	1989	
B02	970039	Namibie	Rundu ?	1994	
B02	970041	Botswana	Nata?	1995	
B02	970038	Botswana		1995	
B03	T2 34	Tanzanie	Morogoro ?	1956	
B03	99048	Inde	Izatnagar ?	1999	Origine caprine
B03	Gladysdale	Australie	Gladysdale	<1965	
B03	Pillai	Soudan	Malakal ?	1960	
B04	2004/003	Zambie	Sesheke	2004	
B05	V5	Australie	?	1938	Souche vaccinale
B06	Asmara	Erythrée	Asmara	inconnue	Souche vaccinale
B07	99021	Kenya-Tanzanie		1999	Variant T1
B07	T1SR	Tanzanie	Korogwe ?	1951	Souche vaccinale
C01	94158	Portugal	?	1994	
C01	PO2	France		1981	
C01	99065	Italie	Brescia	1992	
C02	9335	Italie	?	1992	
C03	PO67	France		1967	
D01	97009	Ethiopie	Makale	1997	
D02	2003/011	Erythrée	Assab ?	2003	
E01	DK32	Sénégal	Dakar	inconnue	Souche vaccinale
E01	9773/804	Guinée	Kankan ?	1993	
F01	PG1	inconnue		inconnue	Souche de référence
G01	Lederle	inconnue	Puigcerda ?	<1967	
H01	Filfil	Sénégal	Filfil	1965	
I01	KH3J	Tanzanie	Juba	< 1948	Souche vaccinale

Tableau II.1 : liste des souches utilisées et leur origine (suite et fin).

Le point d'interrogation (?) indique que l'origine de la souche n'est pas connue avec certitude. Un point d'interrogation précédé du nom d'une localité : origine probable de la souche. <1948 : La souche a été isolée avant 1948 mais la date exacte est inconnue. Les profils (1^{ère} colonne) sont les résultats du système MLSA pour ces souches.

II.2.2. Sélection des locus pour le MLSA

La sélection des locus a été effectuée grâce aux séquences disponibles des souches publiées de PG1 (Westberg, 2004) et 8740-Rita en cours de séquençage au laboratoire (CIRAD-BIOS, UMR15). Tout d'abord, les séquences partielles de la souche 8740-Rita ont été comparées à celles de PG1 et des sites polymorphes entre les deux souches ont été identifiés. La comparaison s'est faite sur environ 800 000 paires de bases en dehors des IS et des zones dupliquées du génome. Ainsi 20 sites polymorphes ont été retenus pour une première validation : sept sont situés sur les gènes de ménage, sept sur des gènes codant pour des lipoprotéines ou des protéines transmembranaires et six autres sur des zones non codantes. La position de ces locus sur le génome de PG1 est indiquée sur la figure II.1. Le potentiel de ces locus a été évalué sur 5 souches de MmmSC venant de régions différentes : PO67 (France), 94111 (Rwanda), Filfili (Sénégal), Gladysdale (Australie) et la souche PG1 séquencée par l'équipe de Westberg (Westberg et al., 2004). Dix locus qui avaient suffisamment de polymorphismes ont été retenus pour le typage des 51 souches de MmmSC par MLSA. Mais en cours d'étude, deux locus qui avaient soit des résultats redondants (Loc-PG1-0233), soit une très faible variabilité (Loc-PG1-0194) ont été écartés. La liste des 8 marqueurs retenus en définitive et les séquences des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage figurent dans le tableau II.2.

II.2.3. PCR et séquençage

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µl contenant 5 µl de tampon de PCR, 0.2 unité d'enzyme (Taq polymérase de Qiagen), 0.4 µM de chaque amorce, 150 µM de dTTP et dATP, 300 µM de dGTP et dCTP. Les échantillons conservés en tampon de lyse sont dilués au 1/100 dans de l'eau distillée et 1 µl est ajouté à la réaction de PCR. Les thermocycleurs GeneAmpPCR System 2400, 9700 ou 9600 de PerkinElmer ont été utilisés selon la disponibilité de chaque machine. Des essais préalables nous ont permis de déterminer la dilution optimale des échantillons, la concentration du magnésium dans les réactions de PCR et la stabilité des échantillons conservés en tampon de lyse à +4°C ou -20°C. Les produits d'amplifications ont été contrôlés sur un gel d'agarose à 1 % (Seakem GTG dans le TAE 1 X). Les produits d'amplification avec une bande unique ont

été envoyés chez Cogenics (Meylan, France) pour être séquencés avec les amorces correspondantes. Ils ont été séquencés dans les deux sens.

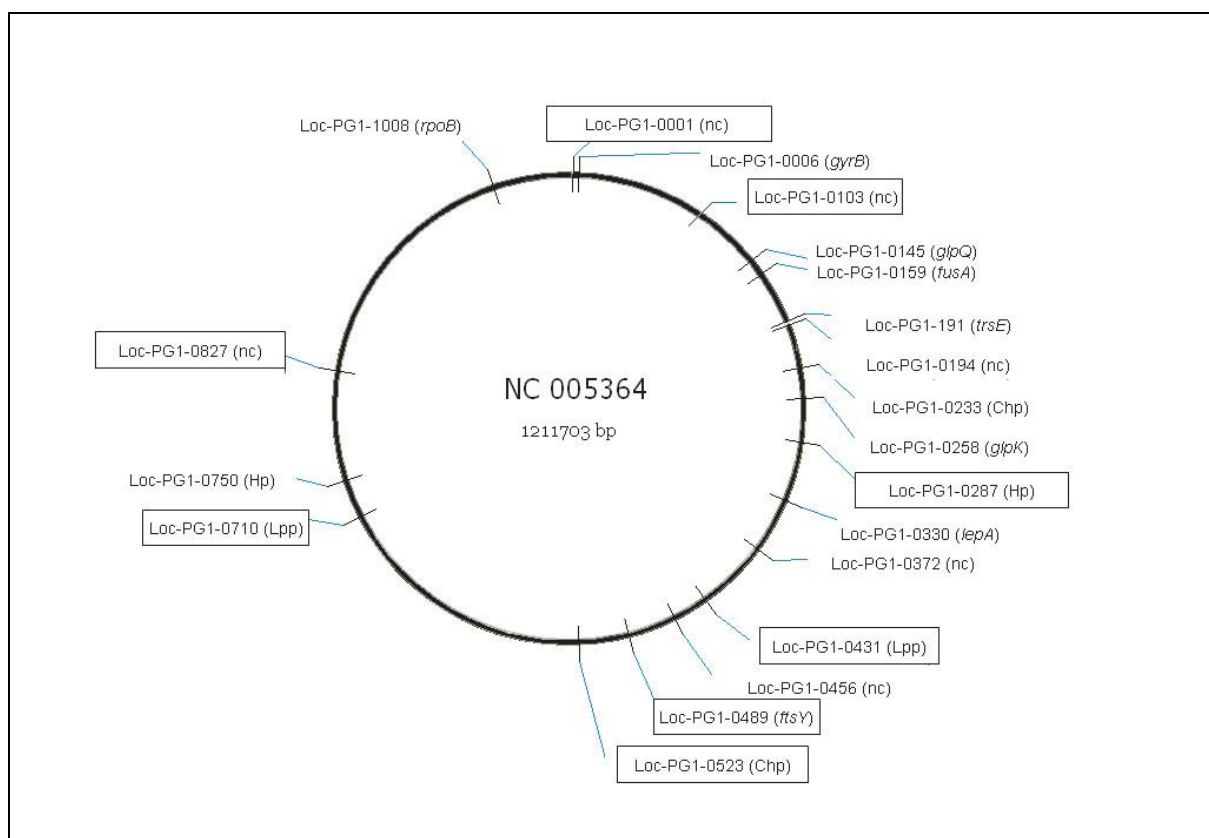


Figure II.1 : distribution des 20 locus retenus pour la pré-validation du système MLSA sur le génome de PG1 (NC_005364).

Les marqueurs retenus pour le système MLSA sont encadrés par un rectangle. Les marqueurs sont identifiés par les numéros de leurs CDS sur la séquence de PG1. Entre parenthèses, les produits pour lesquels, les gènes codent. Nc : séquence non codante, Lpp : lipoprotéine, Hp : hypothetical protein ; Chp : conserved hypothetical protein. *ftsY*, *glpK*, *trsE*, *glpQ*, *fusA*, *lepA*, *gyrB* : gènes de ménage qui font partie des 20 locus retenus pour la pré validation.

II.2.4. Analyse des profils alléliques

Les séquences obtenues avec les différents couples d'amorces ont été assemblées avec le logiciel Vector NTI Suite™ d'Informax (Gorelenkov et al., 2001). Les séquences obtenues des différentes souches pour chaque locus ont été alignées avec ClustalW (Vector NTIND). Les sites polymorphes ont ensuite été vérifiés pour d'éventuelles erreurs au niveau des séquences d'origine. Un nouveau numéro d'allèle a été attribué chaque fois qu'il y a un changement de nucléotide dans la séquence. A la fin, chaque souche a été caractérisée par son profil allélique qui est une combinaison des numéros d'allèles des huit locus.

Locus	Amorces	Position sur PG1	Séquences (5'- 3')	Taille des amplifiats (bp)
Loc-PG1-0001	Loc-PG1-0001-F	1272	AACAAAAGAGATCTTAAATCACACTTTA	538
	Loc-PG1-0001-R	1809	CCTCTTGTTTAACTTCTAGATCAGAAT	
Loc-PG1-0103	Loc-PG1-0103-D	121796	GATGGATATAATCTATACTAGCATTTA	1321
	Loc-PG1-0103-F	123116	CCTTATATAGATAAAAACCTCCTCTTA	
Loc-PG1-0287	Loc-PG1-0287-F	328750	GATTGCTTTAATCAATTTCTTACTGA	545
	Loc-PG1-0287-R	329294	GGATAACCTTGATTTTTTATTGCTTTA	
Loc-PG1-0431	Loc-PG1-0431-F	485201	CAATTCTTTAAATTTGGGTTTGTT	608
	Loc-PG1-0431-R	485808	CTTGCAAGAGTATTTAGATTTGATTA	
Loc-PG1-0489	Loc-PG1-0489-F	555289	GTTAGTTGTTGAAATGTTAGATAT	756
	Loc-PG1-0489-R	556044	CCCATATCAGTTTGGATTAA	
Loc-PG1-0523	Loc-PG1-0523-F	597315	ACAGCATTTGATCAAGATTTAAGTAGTT	824
	Loc-PG1-0523-R	598138	TTACCTAGGTGTTTAAAACCTTCATTTG	
Loc-PG1-0710	Loc-PG1-0710 -F	816093	CCAGTTGAACCATTTATTTTATATATACCT	643
	Loc-PG1-0710-R	816735	AAATATAAGTGGTGCTGGAATAACA	
Loc-PG1-0827	Loc-PG1-0827-F	940048	AGTTGTACAACGTATGAATCTATGATTAT	619
	Loc-PG1-0827-R	940666	CAGGATATACTTCAAAAATTAAGGTTT	

Tableau II.2 : liste des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage pour le système MLSA. 8 marqueurs ont été utilisés pour la validation finale du système MLSA.

Le résultat, sous la forme de matrice correspondant à 31 profils alléliques différents (tableau II.4) a été analysé avec le logiciel eBurst V3 (<http://eburst.mlst.net/v3/>). Le logiciel d'analyse eBurst, développé par E. Feil (Feil et al., 2001), fait ressortir les relations entre les isolats bactériens très proches les uns des autres, identifie un « type ancestral »

(ou « founding genotype ») à partir duquel les autres auraient évolué. L'algorithme prédit les descendants probables de chaque type ancestral et exprime les résultats sous-forme de diagrammes (figures II.18 et II.19). Les paramètres standards d'analyse pour le système MLST ont été utilisés mais le nombre de locus a été fixé à 8. Chaque souche a alors été caractérisée par une lettre correspondant à son groupe et ensuite par un nombre correspondant à son profil allélique.

II.2.5. Analyse d'épidémiologie moléculaire

Pour les souches dont l'origine géographique est connue, les coordonnées (longitude et latitude) ont été obtenues sur internet (<http://earthsearch.net/intSearch/>). Lorsque l'information faisait défaut, une situation géographique a été toutefois attribuée à la souche en tenant compte de la situation épidémiologique de la PPCB dans le pays. Les localités d'origine ont ensuite été placées sur une carte géographique avec le logiciel MapInfo Professional 7.0 (MapInfo Corporation).

II.2.6. Amplification et amorces pour le MLVA.

L'étude a porté sur les mêmes souches qu'en MLSA (Tableau II.1).

- Marqueurs retenus

Les locus potentiels pour le MLVA avaient été identifiés à l'INRA de Bordeaux (Janis, 2006). Trois de ces marqueurs avaient une variabilité plus importante que les autres. Nous les avons retenus pour validation sur notre échantillon de souches. Les noms, les séquences et la position de ces marqueurs sont indiqués dans le tableau II.3. Les échantillons en tampon de lyse ont été amplifiés comme décrit plus haut dans ce chapitre.

Amorces	Séquence (5'-3')	Position sur le génome de PG1	Tm (°C)	Taille de l'amplifiat sur PG1
TR FT1S	TTTTTGCGATTTCAGGTCTT	122328	54	285
TR FT1R	TTGAGCCAACAGCAGTAAATG	122612	60	
Eh Ch TR34L	ATTCAAATGTAACCAATCAGC	451976	56	261
Eh Ch TR34R	GATTGCTTTGATTAACCTTGTTG	452235	58	
Eh Ch TR39L	ACATTGATGCTTCATTAAACTG	748592	58	194
Eh Ch TR39R	AGACTGAAAACATAAAAGTGAAC	748785	60	

Tableau II.3 liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR pour validation du système MLVA.

Trois couples d'amorces identifiés par l'INRA de Bordeaux ont été utilisés pour la validation du système MLVA. La position de la 1^{ère} base sur la séquence de PG1 est indiquée dans la 3^{ème} colonne.

II.2.7. Electrophorèse et analyse des résultats de VNTR

Après amplification, les produits de PCR sont vérifiés par migration sur un gel d'agarose à 1 %. Ensuite, 7 µl de produit de PCR sont séparés sur un gel à 4% (agarose Nuseive 3 :1 dans le TAE) à 25 volts. Les conditions de migration ont été testés à la température ambiante et sous froid dans la chambre froide à 4°C. A chaque électrophorèse, les amplifiats de PG1 et/ou 8740 ont été utilisés comme contrôle.

II.2.8. Estimation de la taille des fragments.

- par le logiciel VISION CAPTUREND.

Le logiciel VISION CAPTUREND a été utilisé pour estimer la taille des fragments amplifiés. Deux marqueurs de poids moléculaires ont été utilisés : Marqueur de 50 paires de bases pour calibrer (premier puits) et le marqueur de 100 pb qui sert de contrôle (sur le dernier puits).

- Estimation visuelle de la taille des fragments.

La photographie effectuée sur Vision Capture est traitée avec un logiciel de traitement d'images Adobe Photoshops Elements 5.0ND. La taille des produits d'amplification est estimée grâce au marqueur de poids moléculaire mis en migration en même temps que les

produits de PCR. Le marqueur « low molecular weight marker » de Biolabs, par exemple, est constitué de 11 fragments de taille : 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 766 paires de bases. La distance de migration de chaque fragment a été mesurée sur la photo du gel grâce à la règle du logiciel Photoshop Elements 5.0. Les distances mesurées ont servi à tracer une courbe avec le logiciel Excel. La taille des produits de PCR a été lue sur le graphique connaissant leur distance de migration (Figure II.2).

Pour confirmer les résultats des gels d'agarose, les échantillons amplifiés sur le locus TR34 ont été envoyés pour séquençage à Génome express. Les séquences reçues ont été analysés comme décrit plus haut dans ce chapitre.

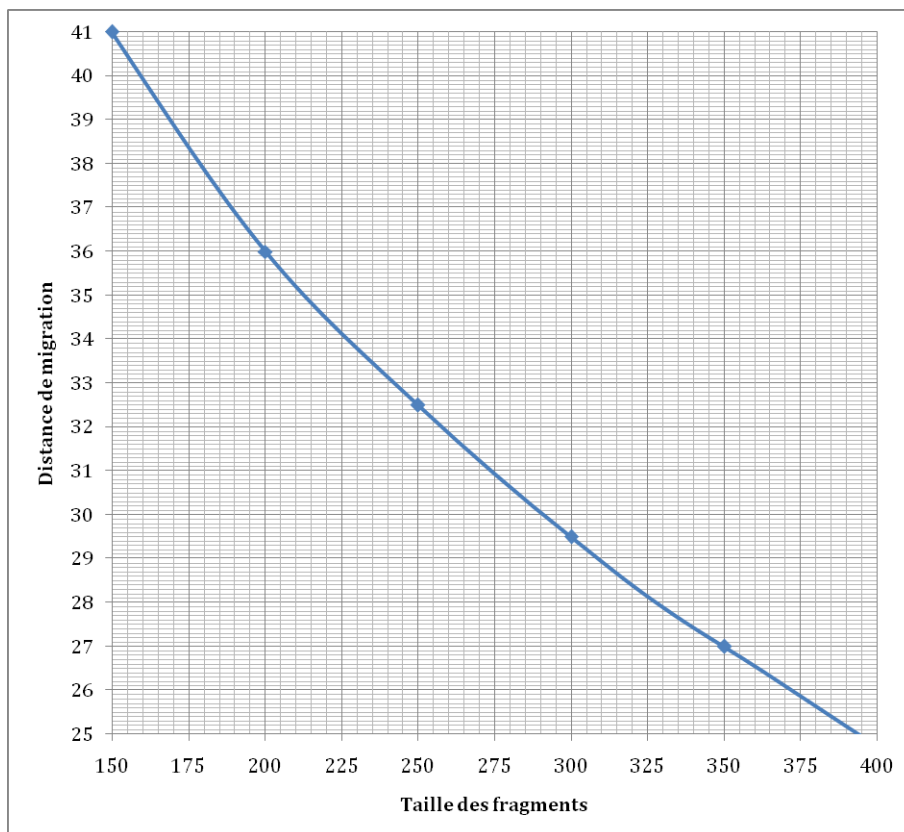


Figure II.2: établissement d'une courbe d'étalonnage avec un marqueur de poids moléculaire pour l'estimation de la taille des produits de PCR. En abscisses, la taille des fragments du marqueur de poids moléculaire. En ordonnées, la distance de migration mesurée grâce à la règle et au grille du logiciel Photoshop éléments 5.0. La courbe est tracée avec Microsoft Excel™.

II.3. RESULTATS DE TYPAGE PAR MLSA

II.3.1. Choix des locus pour le MLSA et première validation.

Le premier objectif de ce travail consistait à rechercher des locus utilisables pour le MLSA. L'étude comparée des séquences de PG1 et 8740-Rita a tout d'abord montré qu'il existait une syntenie parfaite entre les deux génomes, au niveau de toutes les zones non dupliquées, positionnées entre des copies d'IS. Il n'y a donc pas eu de ré-arrangement au niveau de ces séquences entre les deux génomes. Le polymorphisme observé consistait majoritairement en des mutations ou des insertions/délétions ponctuelles (environ 360 sur 800 kpb analysés). Ce qui a justifié notre choix de technique de typage.

Deux locus ne pouvaient pas être utilisés. En effet, les polymorphismes observés entre PG1 et 8740-Rita étaient en fait dus aux erreurs sur la séquence publiée de PG1. En effet dans le gène *lepA* (MSC_0330), le **G** en position 379030 et le **T** en position 379050 sont en réalité des **A**. Ces deux modifications entraînent le changement d'un acide aminé dans la séquence protéique. Dans le gène *trsE* (MSC_0191), le **T** en position 227175 devrait être délété et un **T** devrait être inséré après la position 227214. Ces changements modifient significativement la séquence du produit de *trsE* sur une étendue de 12 acides aminés. Sur la souche vaccinale T1-44, une séquence d'insertion (IS1634) interrompt le gène *trsE* à la position 227363. La fonction du gène *trsE* n'est pas bien connue bien qu'il puisse intervenir dans le transport des grosses molécules, de trafic intracellulaire ou dans la sécrétion. L'interruption de ce gène sur la souche T1-44 montre qu'il n'est pas essentiel. Il faudrait élucider son rôle probable dans l'atténuation de la souche.

Quatre autres locus ont été écartés du système MLSA, le polymorphisme observé était limité uniquement à la souche PG1, les cinq autres souches de MmmSC avaient les mêmes séquences. C'était le cas avec trois locus situés sur des gènes de ménage *fusA* (MSC_0159), *glpK* (MSC_0258) et *rpoB* (MSC_1008) ainsi que le locus Loc-PG1-0372 sur une séquence non codante. Quatre autres locus (Loc-PG1-0145, Loc-PG1-0194, Loc-PG1-0456 et Loc-PG1-0750) ont été éliminés car ils n'apportaient pas d'informations nouvelles par rapport au locus Loc-PG1-0489. Le locus Loc-PG1-0233 a également été exclu dès lors qu'on ne distinguait que deux allèles sur cette séquence. Toutes les souches d'origine européenne portent l'allèle n° 2 sur ce locus et aucune souche d'une autre origine ne porte cet allèle. Ce qui fait de lui, un bon marqueur des souches européennes. La souche

de référence dont l'origine est inconnue porte l'allèle numéro 2 sur ce locus. Ce qui pourrait indiquer une origine européenne probable. La souche Lederlé, utilisée en Espagne comme souche vaccinale, porte l'allèle n° 1, ce qui semble indiquer qu'elle ne serait pas d'origine européenne. Dans le locus Loc-PG1-0194, trois allèles ont été définis mais les résultats redondants ne permettaient pas une meilleure différenciation des souches.

Finalement, huit locus ont été retenus pour le système MLSA. Ces huit locus ont été analysés sur l'ensemble des souches de MmmSC (Tableau II.1).

L'analyse des variations des séquences des différentes souches a montré que de nombreuses séquences codantes (CDS) sont interrompues sur PG1 alors que des CDS plus larges étaient retrouvés sur les autres souches. C'était le cas avec 4 des 8 locus sélectionnés. Les CDS MSC_0103 et MSC_0104 constituent un CDS unique de 370 acides aminés. MSC_0287 et MSC_0288 forment un seul CDS de 713 acides aminés et MSC_0710 et MSC_0711 constituent un CDS de 934 acides aminés. Le CDS MSC_0827 va de 99 à 344 AA.

II.3.2. Robustesse du système MLSA

Afin d'évaluer la robustesse de cette méthode, les cultures de la souche 8740 d'origine et 8740-Rita isolée immédiatement après un passage sur bovin, et puis la souche 8740 ayant subi 11 et 53 passages in vitro ont été analysées. Les souches 94111, Filfilli et Gladysdale ont été testés en double à trois mois d'intervalle. Aucune différence n'a été observée entre les souches ayant subi différents passages ou bien dans les répétitions de tests faits à trois mois d'intervalle. Ces résultats prouvent que les locus retenus sont stables après ces quelques passages et que les différences observées entre souches de terrain sont bien liées à leur évolution et non pas à un manque de robustesse du test.

II.3.3. Allèles identifiés sur les différents locus.

II.3.3.1 : allèles définis sur des séquences non codantes

Les allèles du locus Loc-PG1-0827

Trois allèles ont été définis sur le locus Loc-PG1-0827. Ce locus est le moins discriminant (41 souches portent le même allèle). La souche vaccinale Lederlé possède l'allèle n° 3

(mutation d'un **G** en **A** à la position 940184 du génome de PG1). Les souches européennes possèdent l'allèle n° 2 ainsi que quelques souches africaines (au Tchad, Erythrée). La souche de référence possède également l'allèle n° 2.

Profil - Souche type	Loc-PG1-0489	Loc-PG1-0001	Loc-PG1-0287	Loc-PG1-0431	Loc-PG1-0523	Loc-PG1-0103	Loc-PG1-0710	Loc-PG1-0827
A00-Gemu Gofa	2	1	1	1	1	2	1	1
A01-93130	2	5	1	1	1	2	1	1
A02-Afadé	2	1	1	1	1	3	1	1
A03-B17	2	1	1	1	1	3	1	2
A04-8740	2	4	1	1	1	3	1	1
A05-Muguga	2	1	1	1	1	1	1	1
A06-2000/033	3	1	1	1	1	1	1	1
A07-7721	2	1	4	1	1	2	1	1
A08-96010	2	2	4	1	1	2	1	1
A09-Fatick	4	1	4	1	1	2	1	1
A10-99042	2	1	4	1	2	2	1	1
A11-2000/005	2	2	4	1	2	2	1	1
A12-2003/036	2	3	4	1	2	2	1	1
B01-C8988	4	1	1	1	3	3	2	1
B02-970039	4	1	1	1	3	2	2	1
B03- T2 34	4	1	1	5	3	2	2	1
B04-2004/003	4	1	1	1	3	4	2	1
B05-V5	4	1	1	5	3	3	2	1
B06-Asmara	4	1	1	1	3	3	1	1
B07-T1 SR	4	1	1	1	3	5	1	1
C01-94158	5	1	1	1	5	2	2	2
C02-9335	5	1	1	2	5	2	2	2
C03-PO67	5	1	1	1	3	2	2	2
D01-97009	4	4	1	1	3	2	1	1
D02-2003/011	4	4	1	1	3	2	1	2
E01-DK 32	1	3	1	1	1	2	1	1
E02-9373/804	1	3	1	1	1	3	1	1
F01-PG1	6	1	5	6	3	2	2	2
G01-Lederlé	4	6	3	4	4	1	2	3
H01-Filfili	1	4	2	1	1	1	1	1
I01-KH3J	4	1	1	3	1	2	1	1

Tableau II.4 : matrice des différents profils alléliques.

Dans la première colonne, la première lettre représente le groupe et les nombres à 2 chiffres, le profil allélique. Dans les autres colonnes, les chiffres arabes indiquent le numéro des allèles. Cette matrice a été utilisée pour l'analyse par e-Burst.

Les allèles du locus Loc-PG1-0001

Le locus Loc-PG1-0001 comporte six allèles. Les souches d’Afrique de l’Ouest présentent une grande variabilité sur ce locus. Les souches d’Afrique australe, d’Europe, d’Inde, d’Australie et la plupart des souches d’Afrique de l’Est possèdent le même allèle n° 1.

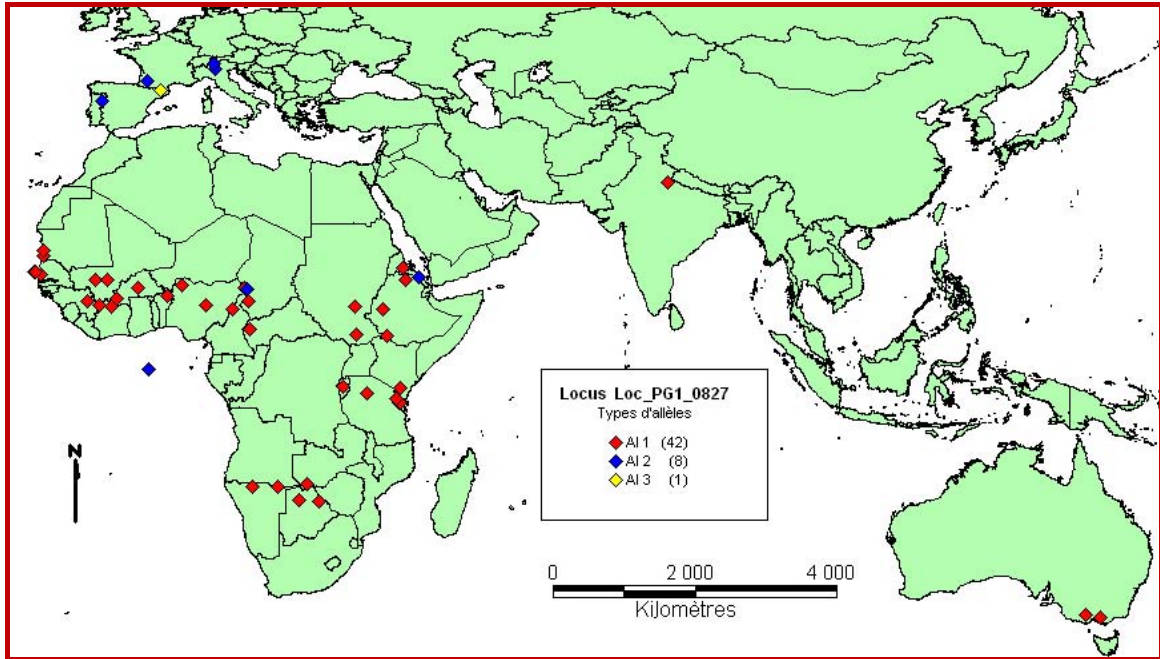


Figure II.3 : carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0827. La majorité des souches porte l’allèle n° 1 (ce locus est peu discriminant). L’allèle 2 est retrouvé sur les souches d’Europe, sur une souche du Tchad, d’Erythrée et sur PG1. L’allèle 3 est identifié sur la souche Lederlé (non visible sur la carte).

Pos :940351

```

94158  GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
8740   GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG
GATATAGATTTAAATATTTAAATTGAAAAGTTCTAGGCTATGAAAAACAATGAACCCATAG

```

Figure II. 4 : alignement partiel des séquences du locus Loc-PG1-0827. Le polymorphisme consiste en une mutation ponctuelle (SNP) G/C à la position 940351. Deux noms de souche représentative sont présentés dans cette figure, les résultats complets sont disponibles dans l’article annexé (Annexe II)

Les allèles du locus Loc-PG1-0287

Cinq allèles ont été trouvés sur le Loc-PG1-0287. Deux allèles sont présents sur la majorité des souches (46 sur 51). L'allèle 5 est retrouvé uniquement en Afrique de l'Ouest alors que l'allèle 1 est ubiquiste. Les autres allèles sont très peu représentés.

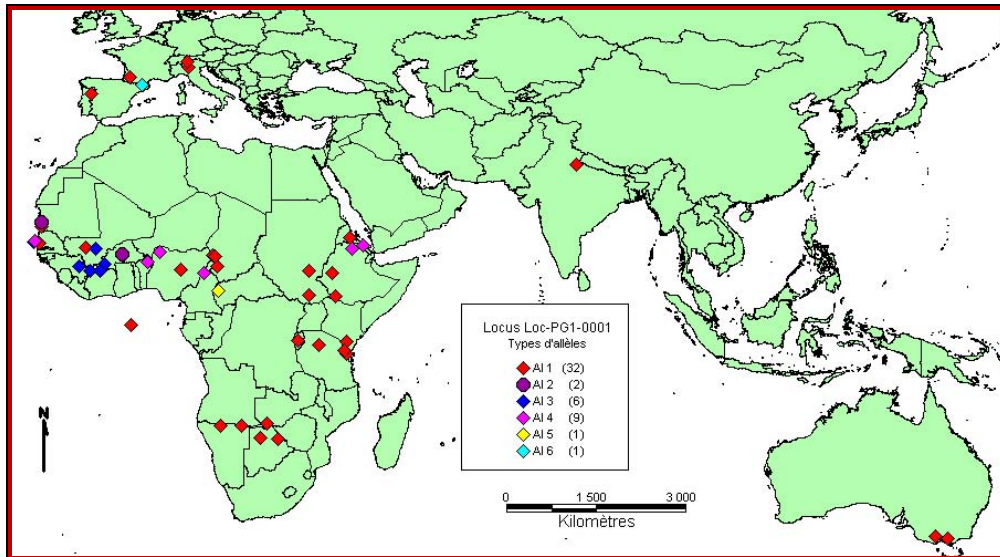


Figure II.5: carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0001.

Ce locus possède 6 allèles. L'allèle 1, majoritaire est retrouvé sur trois continents. On note une grande variabilité des souches de l'Afrique de l'Ouest et du Centre.

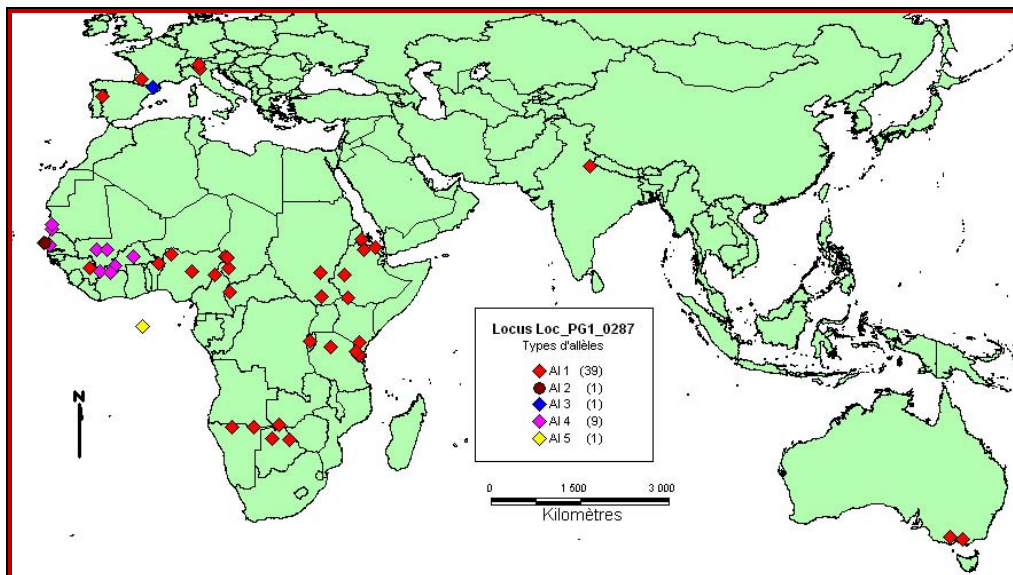


Figure II.6: carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0287.

5 allèles sont identifiés sur le locus Loc-PG1-0287. L'allèle 1 majoritaire est retrouvé sur trois continents. L'Allèle 4 est retrouvé essentiellement en Afrique de l'Ouest. La souche PG1 possède l'allèle 5.

II.3.3.2. Allèles définis sur des gènes dont la fonction est inconnue (lipoprotéines ou protéines hypothétiques)

Les allèles du locus Loc-PG1-0710.

Deux allèles ont été observés sur le locus Loc-PG1-0710. La mutation observée à la position 816297 entraîne une modification d'un acide aminé (d'une leucine en sérine). A l'exception de Pillai, les souches d'Afrique subsaharienne possèdent l'allèle 1 (figure II.7). Les souches d'Europe, d'Inde, d'Australie et d'Afrique australe portent le même allèle. Cette distribution est conforme à l'historique de l'introduction de la PPCB en Afrique australe au 19^e siècle à partir de l'Europe (Newton, 1992).

Locus Loc-PG1-0710	816297	Nombre de souches	Souche type
Al 1	A	30	96010
Al 2	G	18	PG1

Tableau II.5 : récapitulation des polymorphismes sur le locus Loc-PG1-0710. Une mutation ponctuelle a été observée sur ce locus.

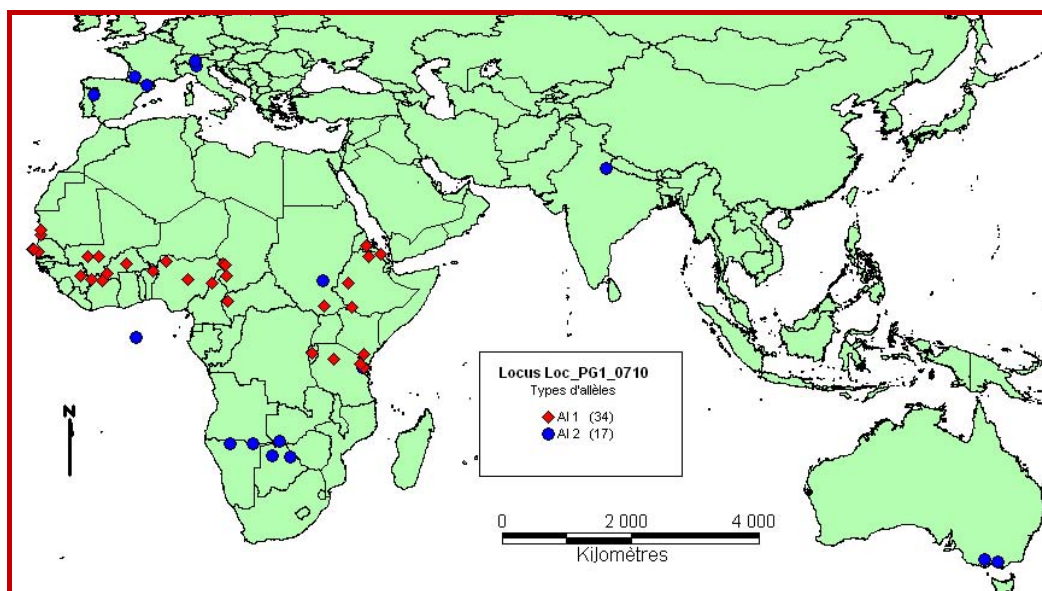


Figure II.7. Carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0710.

Ce locus possède deux allèles. En dehors de la souche Pillai du Soudan dont l'origine exacte n'est pas certaine, toutes les souches de l'Afrique inter-tropicale portent l'allèle n° 1 et les souches d'Europe, d'Afrique australe, d'Australie et d'Inde portent l'allèle 2. La souche PG1 porte également l'allèle 2.

Les allèles du locus Loc-PG1-0523.

Quatre allèles ont été retrouvés sur le locus Loc-PG1-0523. Toutefois quelques souches n'ont pu être typées sur ce locus situé sur la délétion de 8.8 kpb trouvée sur les souches européennes récentes. Le numéro d'allèle 5 a été attribué à ces souches afin de pouvoir effectuer une analyse par eBurst. La souche européenne PO67 a pu être typée sur ce locus et porte le même allèle que les souches d'Afrique australe. Elle pourrait être le représentant le plus proche des souches européennes ancestrales exportées vers d'autres continents au 19^e siècle.



Figure II.8 : alignement partiel des séquences montrant un site polymorphe du locus Loc-PG1-0523. Trois types d'allèles sont identifiables sur cette figure avec trois souches représentatives de ces allèles. Les résultats complets sont présentés dans l'annexe II.

Les allèles du locus Loc-PG1-0103

Cinq allèles ont été définis sur le locus Loc-PG1-0103 situé sur les gènes MSC_0103-0104 codant pour une lipoprotéine putative. Ils correspondent à des répétitions de 5 à 9 triplets (AAT) codant pour l'asparagine (N). Le premier TTA se situant à la position 122439 du

génom de PG1. Apparemment, il ne semble pas y avoir de ségrégation géographique de ces allèles et la distribution serait faite au hasard.

Locus Loc-PG1-0523										
Position sur PG1	497455	597609	597614	597615	597616	597618	597626	597647	Nombre de souches	Souche type
Al 1	T	G	A	A	A	G	G	C	20	DK32
Al 2	G	G	A	A	A	G	G	C	6	9050
Al 3	T	A	T	T	C	A	T	C	17	970041
Al 4	T	A	T	T	C	A	T	T	1	Lederlé
Al 5	Pas d'amplification (délétion de 8.84 kb), souches européennes récentes							4	PO2	

Tableau II.6 : récapitulation des sites polymorphes du locus Loc-PG1-0523.

Les souches européennes récentes ne sont pas typables sur ce locus en raison d'une délétion d'un fragment de 8,8 kpb. Les nombres à six chiffres dans la 2^{ème} ligne indiquent la position du site polymorphe sur le génome de PG1. Cinq allèles ont été identifiés sur ce locus. Les lettres en gras indiquent la mutation qui est intervenue à cette position.

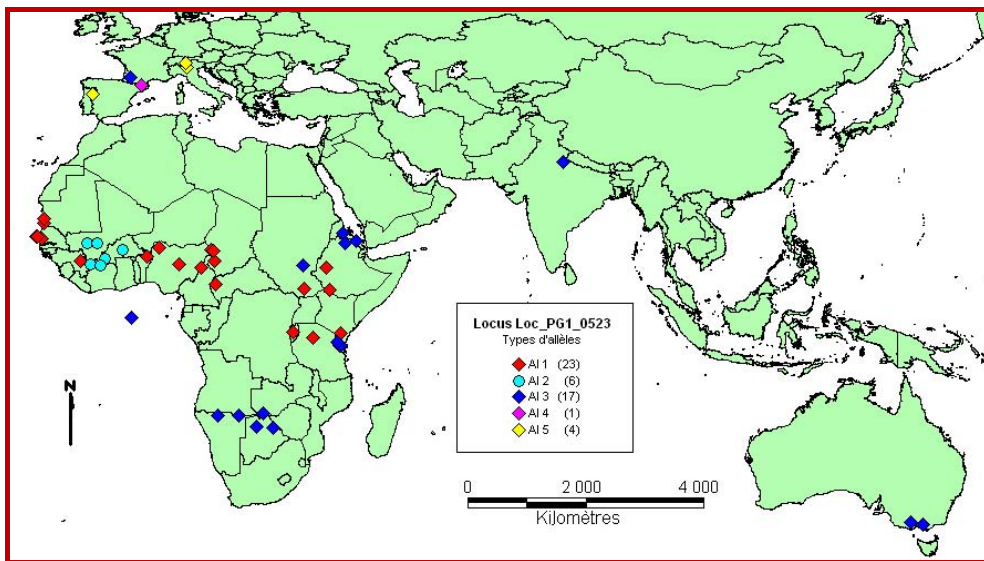


Figure II.9: carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0523. La souche européenne PO67, les souches d'Afrique australe, d'Inde, d'Australie et certaines souches d'Afrique de l'Est, ainsi que PG1 possèdent le même allèle 3.

Locus Loc-PG1-0103			
	Nombre de TTA à partir de la position 122439	Nombre de souches	Souches type
Al 1	5	7	94111
Al 2	6	29	Pillai
Al 3	7	9	Afadé
Al 4	8	1	95014
Al 5	9	2	T1SR

Tableau II.7 : récapitulatif des sites polymorphes du locus Loc-PG1-0103.

5 allèles ont été identifiés sur le locus Loc-PG1-0103. L'allèle 1 est majoritaire suivi de l'allèle n° 3.

Muguga	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG		
Filifili	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG		
94111	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG		
9050	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG		
Lederlé	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG		
99048	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
91130	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
83162	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
99065	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
Pilai	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
9373/804	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
PO1967	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
Pg1	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
B17	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
Asmara	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
Afadé	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
V5	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
2004/003	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
C8988	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
9048	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
Vom)	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG	
95014	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG
8740	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG
99021-T1B	TCAATAAC	TTTAA	TTTATTATTA	TTTA	TTTA	-----	GTATTAAT	TTTCAGG

Figure II.10 : alignement partiel des séquences du locus Loc-PG1-0103. Le nombre de répétitions de TTA varie de 5 à 9. Les triplets répétés ont été coloriés pour être plus visibles.

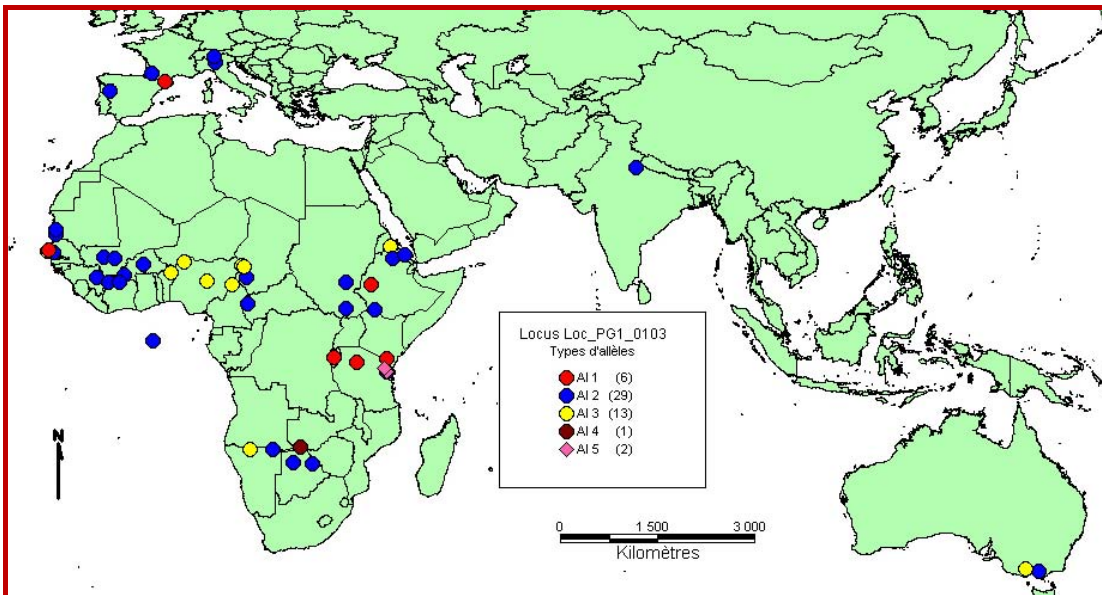


Figure II.11: carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0103. Cinq allèles ont été identifiés sur le locus Loc-PG1-0103. L'allèle 2, majoritaire est retrouvé en Europe, Afrique, Inde et Australie. L'allèle 1 est identifié en Afrique de l'Est, l'allèle 3 en Namibie, Erythrée, Australie, Afrique de l'Ouest et du Centre. Les allèles 4 et 5 en Afrique de l'Est et australe.

Allèles du locus Loc-PG1-0431

Six allèles ont été définis sur le locus Loc-PG1-0431. Ce locus est peu discriminant, la majorité des souches (39/51) portent l'allèle 1. Les autres souches diffèrent par des

et 18 souches respectivement. Un de ces allèles a été retrouvé en Afrique de l’Ouest et lors des récents foyers en Afrique de l’Est alors que le second allèle a été retrouvé surtout en Afrique de l’Est, en Afrique australe, en Australie et en Inde. Toutes les souches européennes portent le même allèle 5 sur ce locus (figure II.15)

Locus Loc-PG1-0431									
Allèles/ position	485305	485470	485517	485524	485567	485572	485615	Nombre de souches	Souches type
Al 1	C	A	G	G	T	G	C	39	96010
Al 2	T	A	G	G	T	G	T	1	9335
Al 3	C	A	A	G	T	G	C	1	KH3J
Al 4	C	G	G	G	T	G	C	1	Lederlé
Al 5	C	A	G	G	C	C	C	5	V5
Al 6	C	A	G	A	T	G	C	1	PG1

Tableau II.8 : récapitulation des sites polymorphes du locus Loc-PG1-043. Le SNP est indiqué en gras. Les positions des mutations sur le génome de PG1 sont indiquées à la 2^{ème} ligne par des chiffres arabes.



Figure II.14 : alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0489. Ce locus est caractérisé par des délétions de 9, 18 et 36 pb et par une mutation d’un A en T.

II.3.4. Définition et répartition des profils alléliques.

A la fin, les 51 souches ont été caractérisées par leur profil allélique et 31 profils différents ont été identifiés. Les événements génétiques qui caractérisent ces différents ces allèles ont été repris dans le tableau II.8.

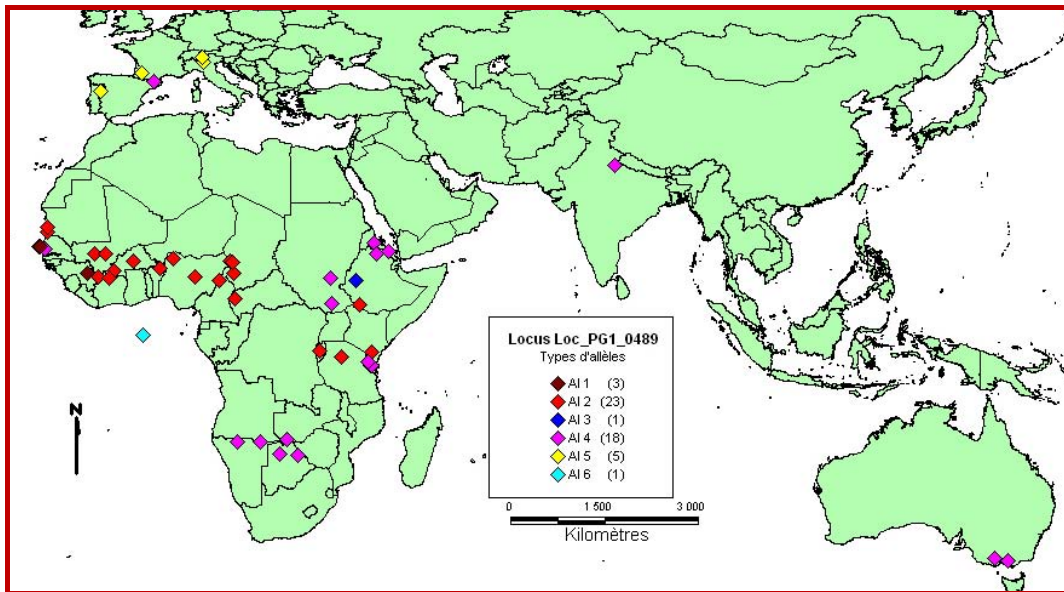


Figure II.15: carte de la répartition des allèles le locus Loc-PG1-0489.

Les souches européennes possèdent le même allèle (allèle 5) sur ce locus sauf pour la souche Léderlé dont l'origine exacte est incertaine. L'allèle 2 majoritaire est rencontré essentiellement en Afrique de l'Ouest, du Centre et de l'Est ; l'allèle 4 avec 18 échantillons est identifié en Afrique australe, Afrique de l'est, en Australie et en Inde. L'allèle 2 est retrouvé en Afrique de l'Ouest (Sénégal et Guinée). La souche PG1 porte l'allèle n° 6.

II. 3.4.1 Groupes de souches obtenus par MLSA.

L'analyse par eBurst a permis l'identification de trois groupes principaux de souches (figures II.16 et II.17). Le groupe A, le plus vaste comprend 24 souches qui se répartissent en 13 profils alléliques différents. Les profils alléliques les plus vastes (A04, A05 et A12) ont jusqu'à 4 souches. Le groupe A est retrouvé en Afrique de l'Ouest et du Centre et quelques souches sont en Afrique de l'Est. Il faut noter que tous les récents isolats d'Afrique de l'Est partagent le même profil (A05). Le groupe B comprend 14 souches provenant de l'Afrique australe, d'Afrique de l'Est, d'Australie et d'Inde. Le profil le plus vaste comprend 4 souches de diverses origines (Tanzanie, Australie, Soudan et Inde). La plupart des souches d'Afrique de l'Est ont été isolées avant 1970 (Pillai, T1SR, T2-34 et Asmara) à l'exception d'une souche kenyane qui date de 1999 (souche 99021). Le groupe C comprend des souches isolées toutes en Europe. Enfin, 8 souches avec des profils alléliques particuliers ne peuvent pas être incluses dans les trois groupes précédents. En Afrique de l'Ouest, il s'agit des vieux isolats du Sénégal et de Guinée et en Afrique de l'Est, de la souche vaccinale KH3J. Deux souches isolées récemment d'Ethiopie et d'Erythrée ont aussi un profil particulier qui indiquerait une circulation des souches dans

une zone géographique restreinte. La souche de référence PG1 est celle qui présente le plus de particularités : elle diffère des autres sur la plupart des locus étudiés. La distribution géographique des différents groupes et profils alléliques est illustrée sur la carte de la figure II.16.

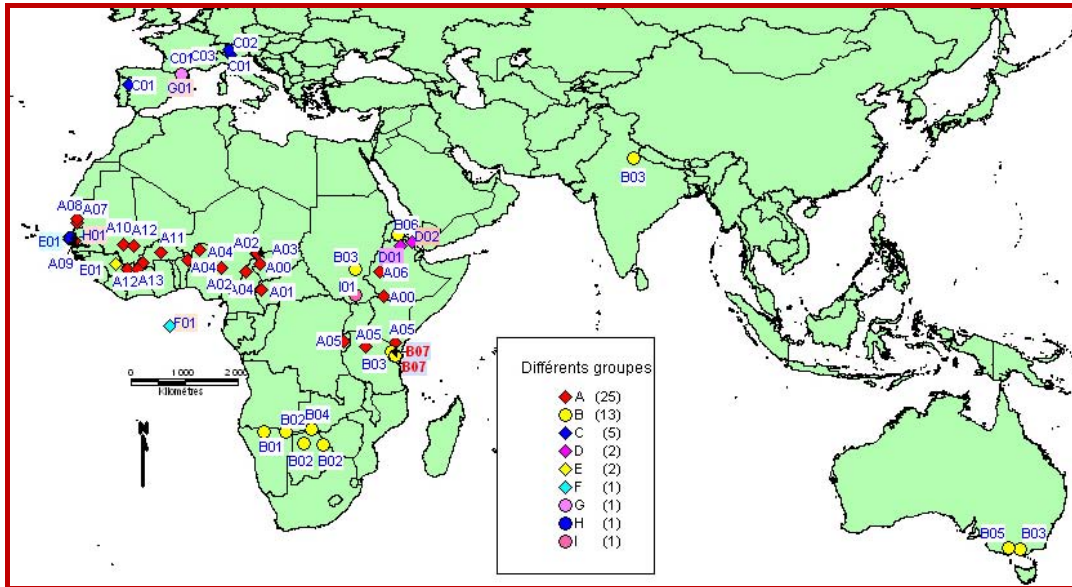


Figure II.16 : carte de la distribution des différents groupes et profils alléliques. Le groupe B est rencontré en Afrique australe, en Inde, en Australie et en Afrique de l’Est. Le groupe A est retrouvé essentiellement en Afrique intertropicale, et le groupe C est rencontré en Europe. La souche PG1 dont l’origine est inconnue n’est pas positionnée dans un pays particulier.

Avec les 8 locus retenus pour le MLSA, 31 profils alléliques ont été identifiés. Ces profils se répartissent en sept groupes : A, B, C, D, E, F et G. Le groupe le plus important en nombre d’isolats a été le groupe A avec 13 profils différents avec des souches isolées entre les latitudes +18 et -4° (latitude de Nouakchott en Mauritanie et Shinyanga en Tanzanie). C’est la zone subsaharienne en dehors des pays de l’Afrique australe. Les souches Gemu Gofa (Ethiopie) et 8162 (Tchad) ont été identifiées par le logiciel eBurst comme les souches ancestrales de ce groupe ; Souches à partir desquelles, il y aurait eu une évolution dans plusieurs directions avec les branches Afadé et Afrique de l’Ouest (Figure II.17 et 18).

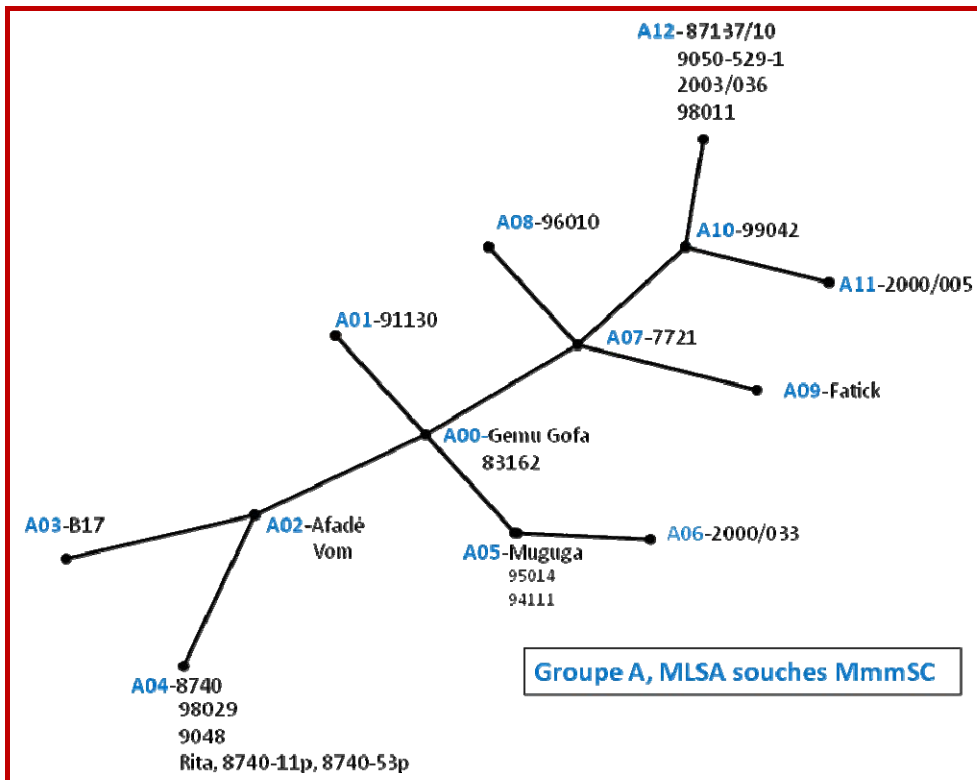


Figure II.17 : résultats d'analyse par e-Burst, souches du groupe A. Le groupe A comprend 13 profils alléliques numérotés de A00 à A12. Chaque profil comprend une à 4 souches.

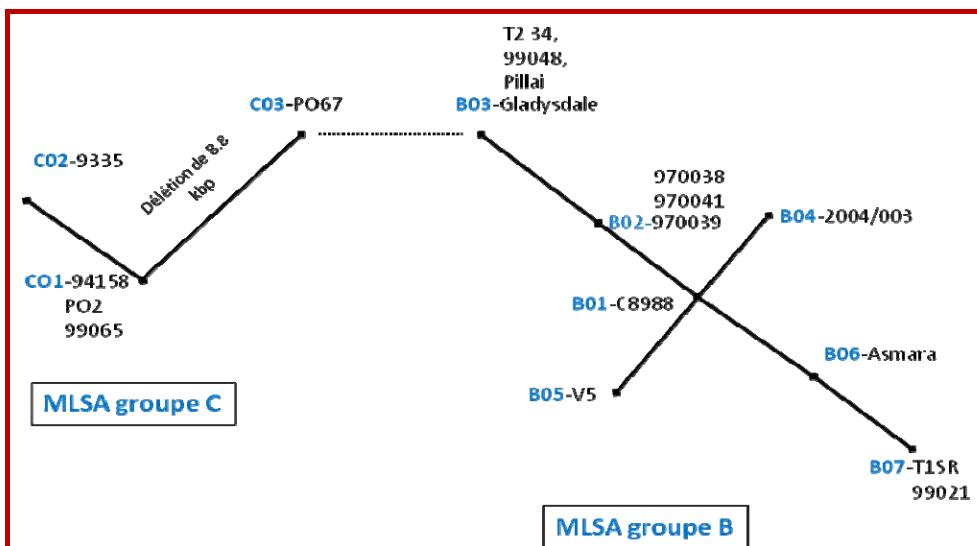


Figure II.18 : résultats d'analyse par e-Burst, groupes B et C. Les groupes B et C ont respectivement 7 et 3 profils alléliques. PO67 (profil C03) serait la souche la plus proche des souches du groupe B isolées en Afrique de l'Est, en Afrique australe, en Inde et en Australie. Elle diffère des autres souches européennes par une délétion de 8,8 kpb.

		Locus Loc-PG1-0001											Loc-PG1-0103	Loc-PG1-287				Loc-PG1-0431				Loc-PG1-0489				Loc-PG1-0523				Loc-PG1-0711	Loc-PG1-0827		N° of strains											
Groups	Profiles	Type strains	1500	1518	1523	1524	1527	1528	1529	1530	1531	1532	From 122439	328887	329008	329113	485305	485470	485517	485524	485567	485572	485615	From 555508	555733	555796	555799	555914	497455	597609	597614	597615	597616	597618	597626	597647	816297	940184	940351	-				
A	A00	Gemu Gofa																						4																			2	
	A01	91130			A																			4																				1
	A02	Atadé											6 ATT											4																				2
	A03	B17											6 ATT											4																			C	1
	A04	8740				T							6 ATT											4															G				6	
	A05	94111											4 ATT											4																			3	
	A06	2000/033											4 ATT											4				A															1	
	A07	7721												T										4																			1	
	A08	96010												T										4																			1	
	A09	Fatick												T										3																			1	
	A10	99042												T										4								G												1
	A11	2000/005												T										4								G												1
A12	2003/036				T						A		T										4								G												4	
B	B01	C8988										6 ATT											3									A	T	T	C	A	T			G			1	
	B02	970041																					3									A	T	T	C	A	T			G			3	
	B03	Pillai																			C	C		3								A	T	T	C	A	T			G			4	
	B04	2004/003										7 ATT												3								A	T	T	C	A	T			G			1	
	B05	V5										6 ATT										C	C		3								A	T	T	C	A	T			G			1
	B06	Asmara										6 ATT												3								A	T	T	C	A	T						1	
	B07	TISR										8 ATT												3								A	T	T	C	A	T						2	
C	C01	94158																					3	II	T						No amplification								G			C	3	
	C02	9335																					3	II	T						No amplification								G			C	1	
	C03	PO1967																					3	II	T						A	T	T	C	A	T			G				C	1
D	D01	97009				T																	3									A	T	T	C	A	T						1	
	D02	2003/011				T																	2									A	T	T	C	A	T						C	1
E	E01	DK32				T					A												5																				1	
	E02	9373/804				T					A	6 ATT											5																				1	
-	F01	PG1																					A	3	II	T						A	T	T	C	A	T			G			C	1
-	G01	Lederlé	T	T								4 ATT											3									A	T	T	C	A	T	T		G	A			1
-	H01	Filipi				T						4 ATT											5																				1	
-	I01	KH3J																					3																				1	
Consensus			C	A	G	A	T	A	G	T	A	A	5 ATT	A	A	G	C	A	G	G	T	G	C	T	K'	LL	A	G	T	G	A	A	A	G	G	C	A	G	G	-				

Tableau II.9 : Récapitulatif des polymorphismes observés sur l'ensemble des souches au niveau des 8 locus étudiés. La dernière ligne du tableau représente la séquence consensus. Les nucléotides identiques à la séquence consensus sont signalés par (.). La 2^e ligne indique la position polymorphe sur la séquence de PG1 (NC_005364). K : nombre d'oligonucléotides répétés (TCAACAAGA) ; LL : GAACCTGTTGTTAATCCAAGATAACAAGTTGAAATA; Les délétions sont signalées par]].

II.4. RESULTATS DE TYPAGE PAR VNTR

Comme la plupart des laboratoires de diagnostic en Afrique réalisent des migrations de produit de PCR dans des gels d'agarose, nous avons voulu tester cette méthode pour déterminer la taille des fragments obtenus dans le système « VNTR ».

L'uniformité de la migration des deux cuves de même marque et de mêmes dimensions utilisées en électrophorèse a été vérifiée. Un même produit de PCR a été déposé dans tous les puits d'un gel d'agarose à 4 % (agarose Nuseive 3 :1 en TAE) et la migration a été effectuée toute la nuit sous une tension de 25 volts. Comme le montre la photo II.19, la migration n'est pas uniforme, les échantillons d'un côté du gel (à droite sur la photo) se déplaçant plus vite que les autres. Pour la suite, un marqueur de poids moléculaire est déposé après 4 échantillons afin de limiter cette anomalie de la migration électrophorétique.

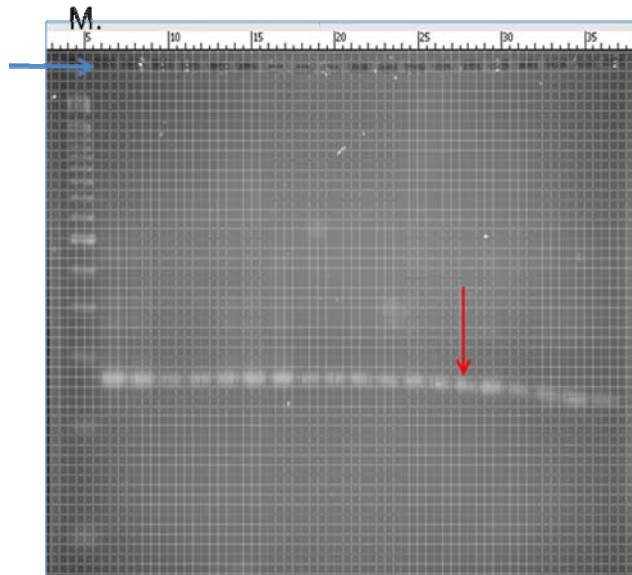


Figure II.19 : photo du gel d'électrophorèse vérifiant l'uniformité de la migration des produits de PCR. M : marqueur de poids moléculaire. 19 aliquotes d'un même produit de PCR ont été mis en migration. A partir du 14^{ème} échantillon (flèche verticale), les échantillons à la droite du gel migrent plus vite que les autres. La grille d'un logiciel de traitement de photos est utilisée pour une meilleure visibilité.

II.4.1. Les allèles du locus TR39.

Sur le locus TR39, Au vu des résultats des gels d'agarose, il y a peu de variabilité entre les souches. Deux allèles ont été identifiés sur le locus TR39 par observation des gels d'agarose (figure II.20). Toutefois, la précision n'étant pas satisfaisante, les résultats n'ont pas été pris en compte dans la validation finale.

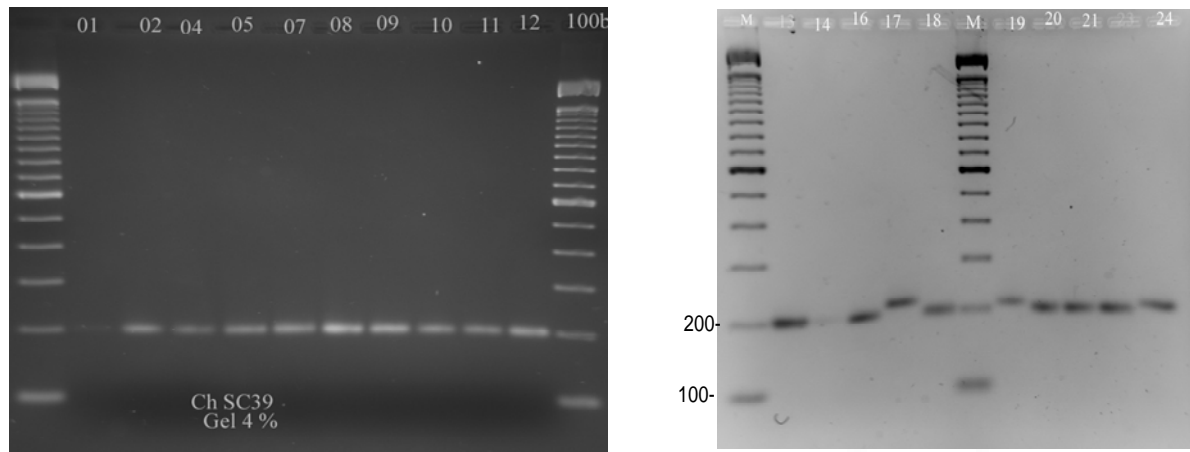


Figure II.20 : Résultats de migration des produits de PCR correspondant au locus TR39. On observe une différence de taille entre certains échantillons (par exemple entre les souches 16 (Muguga) et 17 (98029) ou 19 (B17) et 20 (Asmara) sur cette photo. Echantillons : N° 01:7721, N° 02 :96010, N°04 :97009, N°05 :94158, N°07 :V5, N°08 :Fatick, N°09 :T2-34, N°10 :99021, N°11 : Gemu Gofa, N°12 : KH3J, N°13: 2003/036, N°14 : 970039, N°16 : Muguga, N°17: 98029, N°18 :2003/011, N°19: B17, 20 : Asmara, N°21: 87137-10, N°23 :98011 et N°24 :Vom. M : Marqueur 100 pb de Biolabs.

II.4.2. Les allèles du locus VNTR TR34.

Sur le locus TR34, une bonne variabilité des souches s'observe sur les gels à 4 %. Les résultats du séquençage ont confirmé les observations effectuées sur gel d'agarose. Douze allèles ont été identifiés. Les allèles se répartissent indifféremment dans les différentes zones géographiques. La répartition géographique des allèles est illustrée sur la carte de la figure II.2. Les souches récentes d'Afrique de l'Est (Tanzanie, Kenya, Rwanda) possèdent le même génotype sur ce locus (allèle 6). Ce qui montre une bonne stabilité de ce marqueur.

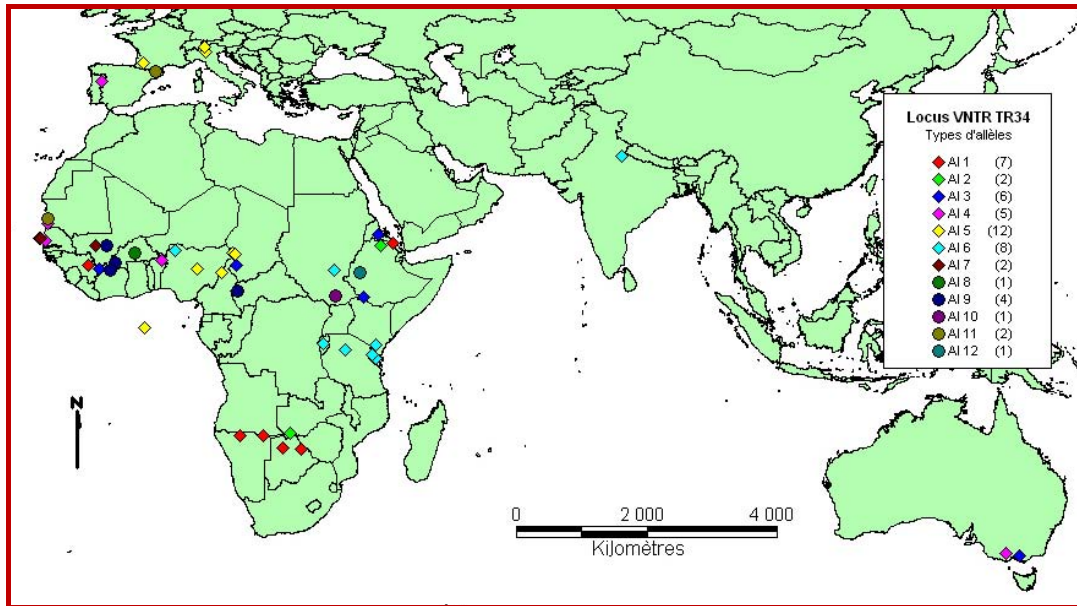


Figure II.21: carte de la distribution géographique des allèles du locus VNTR TR34. 12 allèles ont été définis sur ce locus. Toutes les souches récentes d’Afrique de l’Est portent le même allèle.

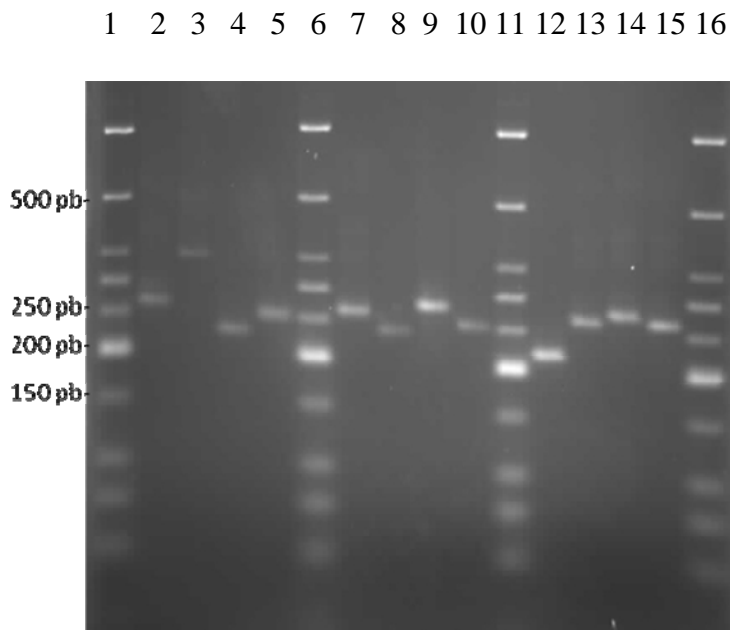


Figure II.22 : photo d’un gel d’agarose à 4 % montrant la séparation des échantillons amplifiés sur le locus VNTR TR34.

Un marqueur de poids moléculaire a été déposé tous les 4 puits. Echantillons de 1 à 16 : M , PG1, 96010, 97009, Fatick, M, 8740, T2 34, Muguga, 98029, M, 2003/011, PO2, gladysdale, B17, M.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

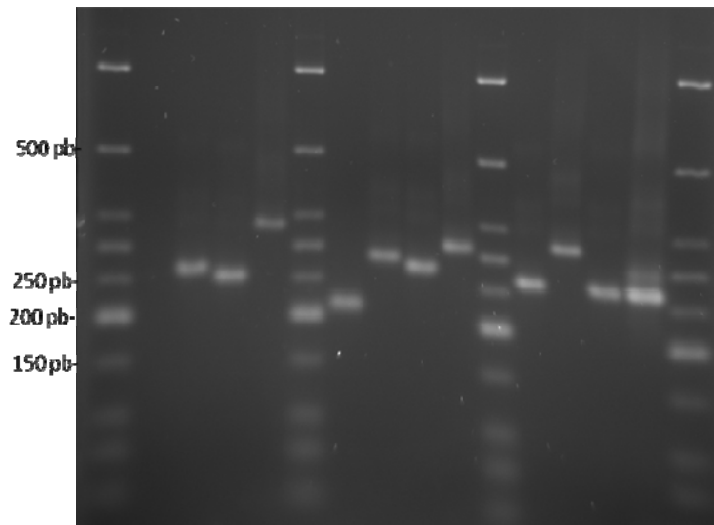


Figure II.23 : photo d'un gel d'agarose à 4 % montrant la séparation des échantillons amplifiés sur le locus VNTR TR34.

Un marqueur de poids moléculaire a été déposé tous les 4 puits. Echantillons de 1 à 16 : M, 7721, 8740, V5, KH3J, M, 970039, 99042, 99048, 2000/005, M, 8740/53p, 91130, 8740/11p, PG1.

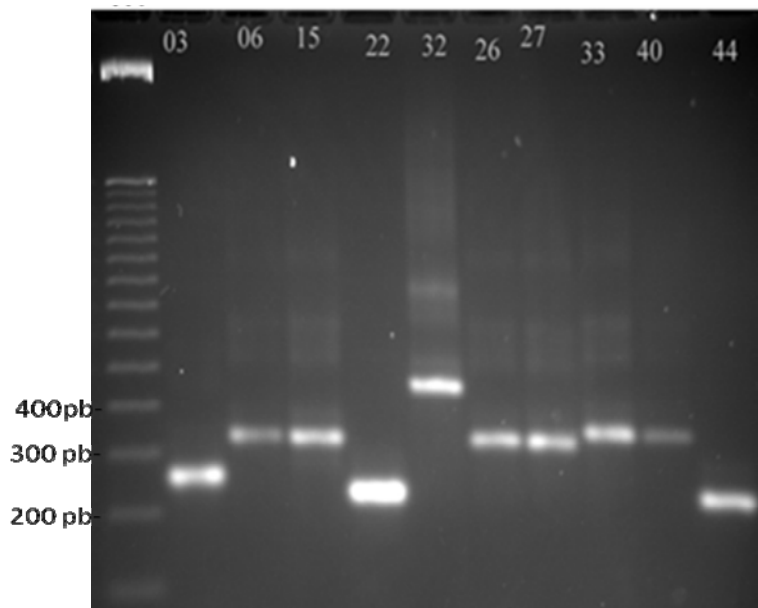


Figure II.24: photo d'un gel d'agarose à 4 % montrant la séparation des échantillons amplifiés sur le locus VNTR TR34.

De Gauche à droite, M : marqueur 100 pb, N° 03 :97009 ; 06 : 8740 ; 15 : Afadé ; 22 : DK32 ; 26 : PO2 ; 27 : 9335 ; 33 : T1SR ; 40 : Gladysdale et 44 : C8988.

II.4.3. Les allèles du locus TRFT1.

Le locus TRFT1 correspond au marqueur Loc-PG1-0103 retenu pour le MLSA. Sur gel d'agarose à 4 %, on observe une variabilité des souches (comme les souches n° 33 (T1SR) et 40 (Gladysdale) sur la photo n° II.25) mais elle ne donne pas une discrimination suffisante pour permettre un typage sur gel d'agarose.

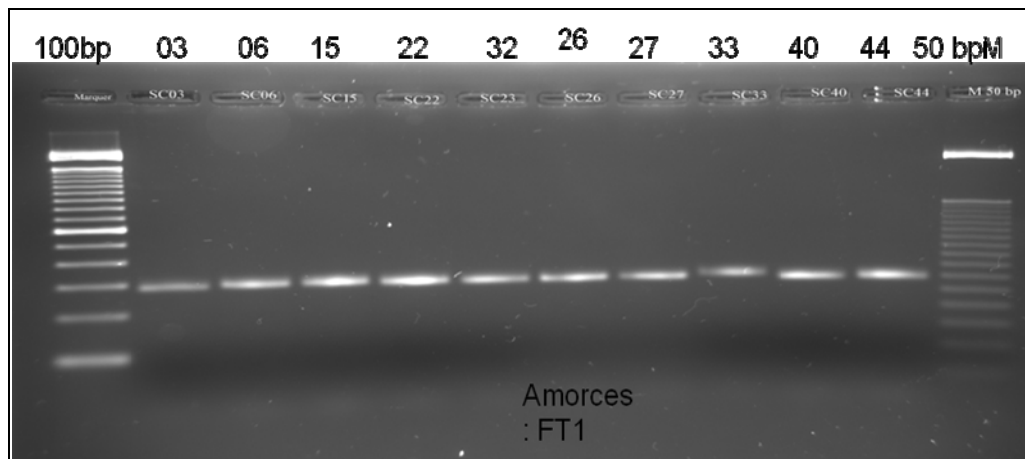


Figure II.25 : photo d'un gel d'agarose à 4 % montrant la migration des échantillons amplifiés sur le locus TRFT1.

Gel à 4% des échantillons amplifiés sur le locus TRFT1. N° 33 (souche T1SR) a apparemment une taille différente de celles des autres échantillons. N°03 : Souche 79009, n° 06 : 8740, n° 15 : Afadé, n° 22 : DK32, n° 32 : 83162, n° 26 : PO2, n° 27 : 9335, n° 33 : T1SR, n° 40 : Gladysdale et n° 44 : C8988. Marqueurs : A gauche, 100 pb Biolabs et à droite du gel : marqueur 50 pb de Biolabs.

II.5. RESULTATS COMBINES MLSA et MLVA.

Parmi les trois marqueurs MLVA analysés, c'est le locus TR34 qui possède un fort pouvoir discriminant. Il a en effet permis d'identifier 12 allèles parmi 51 souches. Son adjonction aux marqueurs MLSA fait passer le nombre de profils alléliques de 31 à 36 et cela apporte plus de précision dans certains groupes. Dans le groupe C, ce marqueur permet une séparation entre les souches d'Italie-France de celles du Portugal. En Afrique centrale, on note une séparation entre les souches du Cameroun, du Nigeria et du Bénin. En Afrique de l'Ouest dans le groupe A12, la souche du Mali se distingue des souches du Burkina Faso et de la Côte d'Ivoire. Dans le groupe B07, il y a une séparation entre les souches d'Afrique de l'Est et celles d'Inde et d'Australie qui possèdent le même profil allélique dans le système MLSA. Les précisions apportées par le TR34 sont résumés dans le tableau II.10.

Profils MLSA	Profils MLSA +TR34	Souches	Origine
A04	A04-a	8740	Cameroun
	A04-b	98029	Bénin
	A04-c	9048	Nigéria
A12	A12-a	2003/036	Mali
	A12-b	87137/10	Burkina Faso
		98011	Côte d'Ivoire
		9050-529-1	Côte d'Ivoire
B03	B03-a	Gladysdale	Australie
	B03-b	T2 34	Tanzanie
		Pillai	Soudan
	B03-c	99048	Inde
C01	C01-a	94158	Portugal
	C01-b	PO2	France
		99065	Italie

Tableau II.10 : apport du locus VNTR TR34 dans la distinction de certains groupes.

Le marqueur VNTR TR34 améliore le pouvoir discriminant du système notamment sur quatre profils alléliques (A04, A12, B03 et C01) qui éclatent en 2 ou 3 nouveaux profils alléliques (colonne 2).

II.6. COMPARAISON DU SYSTEME MLSA AUX AUTRES METHODES DE TYPAGE APPLIQUEES AUX SOUCHES DE MmmSC.

Le pouvoir discriminant peut être utilisé pour comparer différentes méthodes de typage des souches bactériennes. Il est défini comme étant la probabilité pour que deux souches sans lien épidémiologique, choisies de façon aléatoire dans une population donnée, soient reconnues différentes par le système de typage retenu (Van Belkum et al., 2007). Cette probabilité (encore appelée index de diversité) est calculée selon la formule de Simpson comme suit :

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

Où N représente le nombre de souches de l'échantillon, S le nombre total de types ou profils, n_j le nombre de souches possédant le profil j, j allant de 1 à S (Van Belkum et al., 2007). Un système de typage idéal aurait un pouvoir discriminant de 100 %. Nous avons utilisé la

formule de Simpson pour calculer le pouvoir discriminant de certaines méthodes de typage appliquées sur les souches de MmmSC (tableau II.11). Il se dégage de ces calculs, que le MLSA a le pouvoir discriminant le plus élevé suivi de MLVA. Les deux systèmes MLVA décrits (C. Janis et McAuliffe) ont le même pouvoir discriminant alors que les auteurs ont travaillé sur des locus et des échantillons différents. Leur pouvoir discriminant élevé, malgré le faible nombre de locus testés, démontre la puissance de ces méthodes. Les valeurs les plus faibles ont été obtenues avec les typages par AFLP et PGFE effectués par Kusiluka (Kusilula et al., 2001). Cette faible discrimination pourrait être due non pas à la technique mais à l'échantillonnage, la plupart des souches analysées par l'auteur provenant de Tanzanie seraient liées sur le plan épidémiologique. Ces souches dériveraient toutes de la souche à l'origine de la réintroduction de la PPCB dans ce pays dans les années 1990 et peuvent être considérées comme une expansion clonale. Le taux de mutation sur les souches de MmmSC est trop faible pour permettre une distinction de souches ayant évolué dans un laps de temps court de l'ordre d'une dizaine d'années.

Méthode et auteurs	Index de Simpson	Observations
MLSA, présente étude	97 %	48 souches, 31 profils
MLSA (Lorenzon et al. 2003)	84 %	47 souches, 15 profils
MLVA (McAuliffe et al., 2008)	89 %	39 souches, 12 profils
PCR REA bgl (Vilei et al., 2004)	52 %	21 souches, 2 profils
IS1296 (Cheng et al., 1995)	59 %	65 souches, 10 profils
AFLP (Kusiluka et al.,2001)	18 %	60 souches, 6 profils
PFGE (Kusiluka et al., 2001)	19 %	62 souches, 6 profils
MLVA (Janis C., 2006)	89 %	32 souches, 17 profils
Profil gène ptsG (Gaurivaud et al., 2004)	47 %	43 souches, 2 profils

Tableau II.11 : pouvoir discriminant calculée de quelques méthodes de typage de MmmSC. Les index de diversité (colonne 2) sont calculés selon la formule de Simpson et sont exprimés en pourcentage. Le nombre de souches et le nombre de profils identifiés par les différents auteurs sont indiqués dans la 3è colonne. Cependant l'échantillonnage des souches n'a pas été optimisé dans chacune des études de la même manière et pour obtenir le pouvoir discriminant réel il aurait fallu étudier des souches « indépendantes » d'un point de vue épidémiologique. Le pouvoir discriminant des typages par AFLP et PFGF est faible.

Certaines souches ont pu être testées par différents systèmes de typage et cela permet de comparer les résultats. On peut observer un certain nombre de souches pour lesquelles il y a une concordance de résultats quel que soit le système de typage utilisé. C'est notamment le cas pour les souches 98011, 87137-9 et 9050-529-1 qui proviennent respectivement de Côte

d'Ivoire (1998), du Burkina Faso et de nouveau de Côte d'Ivoire (1990). Les trois appartiennent au même type pour les deux systèmes MLSA et les deux dernières testées en Southern 1296 et MLVA ont également le même type dans ces systèmes. Cette concordance obtenue avec des systèmes basés sur des événements génomiques complètement indépendants (SNP détectés sur des locus différents, nombre et position d'IS1296, nombre de répétitions de courte séquence en tandem) montre clairement que ces souches ont un lien épidémiologique fort. Cela est d'ailleurs en concordance avec l'origine de ces souches et de ce qu'on connaît de l'épidémiologie de la PPCB dans cette région. Une concordance partielle est obtenue sur trois souches d'Afrique de l'Est (Muguga, 95014 et 94111). Elles ont le même type dans les deux systèmes MLSA mais elles diffèrent dans le typage Southern IS1296. Cela peut éventuellement s'expliquer par la nature aléatoire de la transposition des IS ou bien de mutation affectant un site de restriction enzymatique. Un de ces événements a dû survenir dans la souche 94111. Nous pouvons également noter que les systèmes de typage basés sur les IS ont une moins bonne corrélation avec les origines géographiques. Pour l'IS1296, les souches de type A1 ont des origines diverses qui vont de l'Afrique de l'Ouest, l'Afrique centrale et de l'Afrique de l'Est ainsi que d'Australie. Il en est de même pour le type C avec l'IS1634.

Souches	Origine	MLSA 2008	MLSA (Lorenzon et al., 2003)	IS1296 (Cheng, 1995)	IS1634 (Vilei et al., 1999)	MLVA (Janis, 2006)	MLVA (McAuliffe et al., 2008)
Gemu Gofa	Ethiopie	A00	A3	-	-	-	-
83162	Tchad	A00	A6	-	-	-	-
91130	RCA	A01	A4	A1	C	-	-
Vom	Nigeria	A02	A	-	-	-	-
Afadé	Cameroun	A02	A	A1	D	MLVA13	152
B17	Tchad	A03	A	A1	D	-	-
8740	Cameroun	A04	A	-	-	MLVA3	-
98029	Benin	A04	A	-	-	-	-
Muguga	Kenya	A05	A2	-	-	-	-
95014	Tanzanie	A05	A2	A1	C	-	-
94111	Rwanda	A05	A2	A6	C	MLVA7	-
2000/033	Ethiopie	A06	A5	-	-	-	-
7721	Mauritanie	A07	B2	A1	-	-	-
96010	Mauritanie	A08	B2	-	-	-	-

Tableau II.12: résultats de typage effectué par différentes méthodes sur les mêmes souches (1^{ère} partie du tableau)

Souches	Origine	MLSA 2008	MLSA (Lorenzon et al., 2003)	IS1296 (Cheng, 1995)	IS1634 (Vilei et al., 1999)	MLVA (Janis, 2006)	MLVA (McAuliffe et al., 2008)
Fatick	Sénégal	A09	A	A1	C	-	-
99042	Mali	A10	B2	-	-	-	-
2000/005	Burkina Faso	A11	B2	-	-	-	-
98011	Côte d'Ivoire	A12	B2	-	-	-	-
87137-9	Burkina Faso	A12	B2	A5	-	MLVA12	-
9050-529-1	Côte d'Ivoire	A12	B2	A5	C	MLVA12	-
C8988	Namibie	B01	D1	-	-	-	-
970038	Botswana	B02	D1	-	-	-	-
970039	Namibie	B02	D1	-	-	-	-
970041	Botswana	B02	D1	-	-	-	-
Pillai	Soudan	B03	A	-	-	-	-
T2 34	Tanzanie	B03	A	-	-	-	-
99048	Inde	B03	A	-	-	-	-
Gladysdale	Australie	B03	A	A1	A	MLVA8	151
V5	Australie	B05	A	A7	A	MLVA17	151
Asmara	Érythrée	B06	A	A1	-	-	-
99021	Kenya-Tanzanie	B07	A7	-	-	-	-
T1 SR	Tanzanie	B07	A7	A4	B	MLVA9	151
99065	Italie	C01	C2	-	-	-	-
PO2	France	C01	C2	E1	-	MLVA1	-
94158-C305	Portugal	C01	C3	-	-	-	-
9335	Italie	C02	C2	-	-	-	-
PO1967	France	C03	C1	-	-	MLVA1	-
DK32	Sénégal	E01	A	-	-	-	-
9373/804	Guinée	E02	B1	-	-	-	-
PG1	Inconnue	F01	A1	P	A	MLVA1	161
Lederlé	Inconnue	G01	D2	-	-	-	-
Filfil	Sénégal	H01	B1	A3	-	MLVA10	-
KH3J	Soudan	I01	A	A2	B	MLVA12	181
43 souches		43 souches	43 souches	17 souches	12 souches	13 souches	6 souches
Profils méthode		28 profils	15 profils	9 profils	4 profils	9 profils	4 profils
Profils MLSA			28	15	6	12	6

Tableau II.12 (suite et fin): résultats de typage effectué par différentes méthodes sur les mêmes souches. Les souches classées ensemble par deux méthodes différentes sont surlignées en couleur pour une meilleure visibilité.

II.7. PROPOSITIONS DE SCHEMA SIMPLIFIE DE TYPAGE SELON LES REGIONS GEOGRAPHIQUES.

Le polymorphisme des locus étudiés n'est pas uniforme d'un point de vue géographique. Par exemple en Afrique de l'Est, toutes les souches ont le même allèle sur le locus Loc-Pg1-0287 (figure II.6) ou le Loc-Pg1-0710 (à l'exception de la souche Pillai (figure II.7)). En Afrique de l'Ouest, les souches possèdent le même allèle sur les locus Loc-Pg1-0431, Loc-Pg1-0710 et 0827. Dès lors, l'insertion de tels marqueurs pour le typage des souches originaires de ces régions apporte peu d'informations pour distinguer les souches entre elles. En réduisant le nombre de locus selon les régions géographiques (Afrique centrale, Afrique de l'Ouest, Afrique de l'Est, Afrique australe), on réduirait considérablement les coûts du typage sans altérer les résultats.

Locus	Afrique de l'Ouest	Afrique centrale	Afrique de l'Est	Afrique australe	Pays indemnes	Europe
Loc-PG1-0001	x	x	-	-	x	-
Loc-PG1-0103	x	x	x	x	x	-
Loc-PG1-0489	x	-	x	-	x	-
Loc-PG1-0287	x	-	-	-	x	-
Loc-PG1-0431	-	-	x	-	x	x
Loc-PG1-0523	-	-	x	-	x	x
Loc-PG1-0710	-	-	-	-	x	-
Loc-PG1-0827	-	x	-	-	x	-
VNTR TR34	x	x	x	x	x	-
Fragment f	-	-	-	-	-	x
Nombre de locus	5	4	5	2	9	-

Tableau II.13 : liste des marqueurs utiles pour le typage des souches en fonction des régions géographiques. X : marqueur à utiliser, - : marqueur non utile pour la région concernée. Fragment f : numéro d'accès à Genbank : AY162462. Ce fragment est amplifié par les séquences f1 : 5'-TCCCATCTTTGCTTATACATATTC-3' et f2 : 5'-TAAATCCTTTTCTTCTTGACC-3' (Lorenzon et al., 2003).

Ainsi en Afrique centrale, quatre locus apportent les mêmes informations que les 9 locus testés. Ces locus distinguent en outre les souches des pays voisins en Afrique de l'Ouest (Nigeria, Niger). En Afrique de l'Ouest, cinq locus suffisent. Toutefois, en ce qui concerne les régions actuellement indemnes comme les pays européens ou l'Australie, en cas de réapparition de la maladie, il faudrait utiliser tous les 9 marqueurs identifiés auquel s'ajoutera le locus du fragment f identifié dans le premier système MLSA (Lorenzon et al., 2003). Les

souches d'Afrique australe ne présentent de variabilité que sur deux locus (VNTR TR34 et Loc-Pg1-0103) tous porteurs de VNTR. La liste des locus utilisables selon l'origine géographique figure dans le tableau n° II.13.

II.8. DISCUSSIONS

Analyse génomique

L'objectif de ce travail était d'établir un système MLSA robuste de typage des souches de MmmSC basé sur la comparaison des séquences génomiques. L'analyse des séquences de PG1 a montré que les amorces définies pour le premier système MLSA (Lorenzon et al., 2003) hybridait sur de nombreux sites ou sur des séquences dupliquées de PG1. La validation initiale des 20 locus sélectionnés a révélé quelques erreurs dans la séquence publiée de PG1. Sur les 20 locus, 2 polymorphismes sont dus aux erreurs de séquençage. Quatre autres sites polymorphes sont spécifiques de PG1. Cette particularité de PG1, dont ni l'origine ni la date d'isolement ne sont connues, avait déjà été soulignée. Par exemple, cette souche possède un large fragment répété de 24 kb, absent sur d'autres souches (Bischof et al., 2006). Cette particularité serait due à des nombreux passages que cette souche a subis dans les laboratoires. Un seul gène de ménage (*ftsY*) a été validé pour le nouveau système MLSA. Il est remarquable que le polymorphisme dans ce gène comprenne la présence d'un nonanucléotide dupliqué codant pour trois acides aminés (Asp-Gln-Gln), présent de trois à cinq copies ainsi qu'une délétion d'un fragment de 36 pb. Comme ce gène joue un rôle fondamental (Angelini et al., 2005), il est fort probable que le polymorphisme ne se situe pas sur le site actif de la molécule.

Analyse épidémiologique

L'existence de trois groupes principaux avec le groupe A trouvé uniquement en Afrique de l'Ouest et du centre peut être une indication que ces souches ont émergé indépendamment de celles qui ont existé en Europe. Ce qui indiquerait que la PPCB aurait existé en Afrique avant la colonisation européenne. Une telle hypothèse avait émergé avec la découverte de la façon dont les Africains prémunissaient leurs animaux contre la PPCB par inoculation du liquide pleural sous la peau du nez (Blancou, 1996). Ce procédé qui entraînait une réaction locale et une exostose avaient amené les premiers colonisateurs à la description d'une nouvelle race de zébus « *Bos triceros* » (Rochebrune, 1880). L'inoculation au niveau du nez était inconnue en

Europe où le site utilisé était plutôt l'extrémité de la queue (Vilei et al., 1999). En outre, un profil allélique ancestral possible serait le profil A00 identifiée au Tchad et en Ethiopie (Région de Gemu Gofa). Dans ces régions, le flux du bétail étranger au 19^e siècle serait faible. Au contraire, la présence du groupe B en Afrique de l'Est pourrait refléter un afflux des animaux infectés en provenance d'Europe soit directement (par exemple de l'Italie vers l'Erythrée alors colonisée) ou indirectement comme lors de l'expédition britannique en Abyssinie en 1868, expédition au cours de laquelle, des bœufs de trait d'Inde utilisés pour le transport de l'artillerie dans les régions montagneuses d'Abyssinie (Hozier et al., 1869), auraient introduit la PPCB dans la région. La situation géographique des souches ayant le même profil allélique sont en concordance avec des données épidémiologiques. Dès lors, la présence de plusieurs souches avec le même profil allélique n'est pas due à un manque de pouvoir discriminant du système MLSA. Par exemple, la présence du profil A05 dans de nombreux pays d'Afrique de l'Est résulterait d'une expansion clonale de la souche kenyane d'origine qui aurait ensuite contaminé les pays comme la Tanzanie ou le Rwanda dans les années 1990 (Masiga et al., 1996). De la même manière, la présence du profil A12 au Mali, au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire sont liés à la transhumance et aux pistes à bétail que suivent les troupeaux de bovins pour le ravitaillement des grands centres urbains dans le sud. La présence du profil A04 au pourtour du lac Tchad serait liée aux mouvements de transhumance des pays du bassin du lac Tchad (Cameroun, Niger, Nigéria et Tchad).

Quoique la souche PO67, d'origine européenne appartienne au groupe C, sa séquence dans les locus Loc-PG1-0233, Loc-PG1-0001, Loc-PG1-0287 et Loc-PG1-0523 a montré qu'elle est très proche des souches du groupe B. La proximité génétique des souches du groupe C, européennes, avec les souches du groupe B, trouvées notamment en Afrique Australe est en accord avec les données historiques d'introduction de la maladie dans la province du Cap au XIX^{ème} siècle. La PPCB a été, en effet, exportée d'Europe vers l'Afrique du sud, l'Australie (Newton, 1992 ; Fischer, 2006) et l'Inde (Shirlaw, 1939). Le probable profil allélique ancestral du groupe B (B01) fait partie des souches d'Afrique australe. La souche européenne la plus proche de ce groupe, PO67, est la plus ancienne souche de notre collection. Elle a été isolée en 1967 en France près de la frontière franco-espagnole. Elle représenterait le parent le plus proche des souches qui ont circulé en Europe au 19^e siècle. Les souches européennes les plus récentes diffèrent de la souche PO67 entre autres, par une délétion de 8.8 kpb. Cette délétion affecte les gènes codant pour le système de transport du glycérol qui serait associé à la virulence (Pilo et al., 2005). Les souches européennes récentes ont un profil particulier qui

n'est pas observé sur les autres souches non européennes. Ce qui indique de plus que les derniers cas de PPCB observés en Europe ne sont pas dus à une réintroduction de la maladie mais plus vraisemblablement par une résurgence à partir des anciens cas passés inaperçus. Cette longue persistance de l'infection par MmmSC en Europe peut être expliquée soit par l'existence d'un réservoir de MmmSC non encore identifié, soit par la circulation des souches peu pathogènes qui auraient par la suite retrouvé leur virulence et entraîné les derniers foyers. La présence des souches de *MmmSC* chez des hôtes en dehors des bovins et buffles domestiques a déjà été décrite notamment chez les caprins chez qui MmmSC ont été régulièrement isolés aussi bien en Afrique qu'en Europe avec quelquefois la reproduction des lésions de PPCB (Dujardin-Beaumetz E., 1906). Dans une tentative de voir si les chèvres pouvaient remplacer les bovins comme modèle d'étude de la PPCB, nous avons testé plusieurs voies d'inoculation de MmmSC aux caprins (Yaya et al, 2000). Certains animaux ont fait une séro-conversion et un animal inoculé par voie intra-péritonéale, a développé des lésions avec multiplication de la souche. Néanmoins, le rôle de la chèvre dans l'épidémiologie de la PPCB serait marginale sinon nulle. Le cas de Botswana en 1994 le démontre. Quand ce pays a été infecté et que l'Etat ait décidé d'abattre tous les bovins de la région infectée (Mullins, 2000), cette mesure n'a pas touché les caprins qui étaient pourtant en contact avec les bovins. La réintroduction des bovins sensibles n'a pas été suivie par une réapparition des foyers, démontrant ainsi que les caprins ne jouent pas de rôle significatif dans la persistance à long terme de la PPCB.

La circulation des souches peu pathogène de MmmSC mais non dépistées semble être une explication de la réapparition de la PPCB en Europe. Il est en effet bien connu que les souches ont divers degrés de virulence, mais la virulence des souches est difficile à mesurer dès lors :

- Qu'il n'existe pas de modèle de petits animaux pouvant reproduire toutes les lésions observables sur bovins ;
- Que les inoculations endobronchiques ne donnent pas toujours de satisfaction même avec des souches qui se seraient montrées pathogènes sur le terrain ;
- Que la transmission par contact est souvent effectuée avec un faible nombre d'animaux. On sait, grâce à une étude faite *in silico*, que des essais effectués avec les mêmes paramètres initiaux peuvent aboutir à des résultats différents (Lesnoff et al., 2004), parfois erronés sur la virulence de la souche.

II.9. CONCLUSIONS

Le système MLST (Multilocus sequence typing) est une méthode sans ambiguïté de caractérisation des souches microbiennes basée sur les séquences des gènes de ménage (Maiden, 1998 ; Mullins, 2000). Les séquences de 500 pb sont normalement utilisées. Pour chaque gène de ménage, les différentes séquences présentes sont considérées comme des allèles différents et un numéro leur est attribué. Chaque isolat est caractérisé par un profil allélique correspondant aux différents allèles présents sur le locus. Dans le MLST, le nombre de nucléotides différents trouvés entre allèles n'intervient pas et les séquences sont numérotées aussi bien quand elles diffèrent par un ou par plusieurs nucléotides. La logique ici veut qu'un seul événement génétique entraîne un nouvel allèle et cet événement peut être une mutation ponctuelle modifiant la position d'un seul nucléotide ou par une recombinaison entraînant des changements sur plusieurs sites. Ce système de typage a été appliqué avec succès sur un grand nombre d'espèces bactériennes telles *Staphylococcus aureus* (Enright et al., 2000), *Campylobacter jejuni* (Dingle et al., 2001) ou *Haemophilus influenzae* (Meats et al., 2003). Cette approche a de nombreuses applications notamment en phylogénie (Hanage et al., 2005) et en épidémiologie moléculaire.

En épidémiologie moléculaire, le MLST peut être utilisé pour l'étude de l'évolution de la résistance aux antibiotiques (Gherardi et al., 2006), l'évolution des souches dans le temps (Perez-Losada et al., 2007) ou la distribution des souches de diverses lignées dans la population (Lacher et al., 2007). Dans le cas de MmmSC, cette approche n'avait pas connu de succès car la variabilité à l'intérieur des gènes de ménages était très limitée. C'est le cas avec les gènes *fusA*, *lepA* et *rpoB*. Sur le plan de l'évolution, ceci pourrait indiquer que les génomes de MmmSC sont homogènes et que ce mycoplasme s'est adapté très récemment à son hôte bovin. Sur le plan pratique, dans cette étude, des gènes dont la fonction est inconnue ou des séquences non codantes ont été retenus pour différencier les souches de MmmSC. C'est pourquoi, cette stratégie a été appelée Multilocus Sequence Analysis (MLSA) au lieu de Multilocus Sequence Typing (MLST). Ce système de typage n'est pas universel. Les séquences cibles ont été sélectionnées pour typer un biotype d'une sous-espèce et pourraient ne pas s'appliquer au typage des souches de rang taxonomique plus élevé. Toutefois, cette technique est robuste comme le MLST. Ce nouveau système de typage peut ouvrir de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension de la plasticité des génomes. A cet effet, il serait intéressant d'obtenir de l'ADN ancestral à partir des prélèvements d'animaux

infectés conservés dans du formol pour histologie. Ce qui permettrait une caractérisation des anciens profils alléliques ayant circulé en Europe et en Afrique pour une meilleure compréhension de l'évolution des souches. Ce système MLSA peut être appliqué à de l'épidémiologie de la PPCB, à la surveillance et au contrôle de cette maladie. Des nouveaux locus pourront être ajoutés pour augmenter la discrimination du système sur des souches très proches les unes des autres. Des souches d'origine caprine seront incluses dans le panel des souches pour voir si leurs profils diffèrent ou non de ceux des souches bovines circulant dans la même région. Les résultats obtenus dans cette étude seront inclus dans un site internet sur l'épidémiologie moléculaire dans un projet financé par l'Union européenne (EPIZONE). Cet outil pourrait faciliter la diffusion des méthodes de typage des souches pathogènes permettant à chaque laboratoire de comparer ses propres résultats à ceux d'une banque de données et obtenir des arbres de phylogénie, actualiser des cartes géographiques si toutefois les coordonnées géographiques des souches sont connues. Un tel outil aura des liens avec des sites des organismes internationaux tels l'OIE (<http://www.oie.int/wahid-prod/>) et de la FAO (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/disease_cbpp.asp) qui fournissent des informations à jour sur les maladies transfrontalières à déclaration obligatoire.

En définitive, le nouveau système MLSA sera utile pour les pays qui courent un risque de réintroduction ou de résurgence de la PPCB et pour ceux qui sont engagés sur la voie d'éradication (pays du sud) en leur permettant de remonter jusqu'à l'origine de l'infection. L'isolement et l'identification des souches de *MmmSC* doivent être effectués régulièrement dans les pays où la maladie est enzootique et aussi dans les pays où elle réapparaît. C'est avec un nombre élevé de souches d'une région que les foyers peuvent être suivis sur le plan moléculaire. Les systèmes MLSA et MLVA seront aussi utiles pour les pays africains comme le Cameroun où la maladie est enzootique mais qui ne peut actuellement par manque de moyens faire recours aux abattages sanitaires. Avec les campagnes annuelles de vaccination, les cas de PPCB vont certes se raréfier. Le typage des souches qui y circulent actuellement pourrait apporter des informations utiles lors de la phase d'éradication permettant de suivre avec plus de précision l'origine des derniers foyers. C'est dans cet objectif qu'une vingtaine de souches de *MmmSC* ont été typées sur certains marqueurs de MLSA et VNTR. C'est l'objet du chapitre III.

CHAPITRE III

VARIABILITE GENETIQUE DES SOUCHES DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC ISOLEES AU NORD-CAMEROUN

III.1 INTRODUCTION

La péripneumonie contagieuse bovine a connu une recrudescence depuis le début des années 1990 dans de nombreux pays africains au sud du Sahara. Le cheptel bovin camerounais n'est pas épargné par cette flambée. Cette recrudescence s'expliquerait entre autres par :

- la baisse de la garde depuis l'arrêt de la vaccination contre la peste bovine en 1999, vaccination qui utilisait un vaccin bivalent (Bivax) contre la peste bovine et la PPCB ;
- le faible taux de couverture vaccinale avec le vaccin T1-SR utilisé pour l'immunisation des animaux ;
- Le faible, voire l'absence, de contrôle des mouvements d'animaux d'une région à une autre ou au niveau des frontières (absence des postes de quarantaine).
- La faiblesse des moyens alloués aux services vétérinaires ;
- L'accentuation des mouvements transfrontaliers du bétail entre le Cameroun, le Tchad, la RCA et le Nigéria en faveur des échanges commerciaux ou pour fuir des zones d'insécurité entretenue par des rebellions ou des brigands (connus sous le nom de « coupeurs de route ») (Saïbou, 2006);
- L'incapacité des services vétérinaires à appliquer les mesures d'abattage des troupeaux atteints en cas de foyers, faute de pouvoir indemniser les éleveurs ;
- L'inexistence jusqu'à fin 2004, d'un système de surveillance épidémiologique des maladies qui permettrait le dépistage des foyers avant qu'ils ne se propagent dans d'autres régions.

Le réseau d'épidémiosurveillance PACE (Programme Panafricain contre les épizooties) a démarré au Cameroun vers la fin de l'année 2004 et a initié un début de surveillance de la PPCB dans les régions où l'élevage bovin prédomine (Adamaoua, Nord, Extrême nord, Est et

Nord-ouest) permettant l'isolement de certaines souches de MmmSC dans les régions septentrionales.

Jusqu'au début des années 1995, les études des profils protéiques en SDS-PAGE avaient conclu à une homogénéité des souches de MmmSC (Costas et al., 1987). Le développement récent des outils d'épidémiologie moléculaire de la PPCB a permis une distinction plus fine des souches d'origines diverses. L'étude du polymorphisme des souches de MmmSC avec les systèmes MLSA et MLVA a montré une variabilité de certaines souches isolées au Cameroun et dans les pays voisins sur certains marqueurs : Loc-PG1-0001, Loc-PG1-0103 et TR34 (Yaya et al. 2008). Ce qui fait de ces marqueurs, des outils potentiels pour une analyse plus fine des souches isolées dans la région Afrique centrale. L'objectif de cette étude était d'évaluer le polymorphisme existant au niveau des souches de MmmSC circulant dans le Nord-Cameroun.

III.2. MATERIELS ET METHODES

III.2.1. Souches de *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* SC;

Les souches de MmmSC ont été isolées dans les régions du nord et de l'extrême nord soit lors des foyers de cette maladie soit à l'occasion des visites effectuées dans les principaux abattoirs de la région. Au total, 20 souches ont été étudiées, la plus ancienne a été isolée à Afadé dans l'Extrême-Nord en 1968 par le laboratoire de Farcha (Njamena, Tchad) et la plus récente provient d'un foyer à Nassarao près de Garoua en 2007. Deux souches proviennent des abattoirs de Pitoa et de Waza. Les noms des souches, leur origine et la situation des foyers sont indiqués dans le tableau III.1 et la carte de la figure III.1. Les coordonnées géographiques des foyers ont été soit relevées au GPS (Garmin60), soit récupérées de la base des données de MEADEN (Mission d'Etude pour l'Aménagement et le Développement de la province du Nord). Les points ont été insérés sur une carte à l'aide du logiciel MapInfo Professionnal 7.0. Toutes ces souches proviennent de la souchothèque du LANAVET. Elles n'ont pas fait l'objet d'un protocole d'échantillonnage.

Identifiants	Date de prélèvement	Localités ou de souches	Départements	Régions	Loc-PG1-0001	Locus TR34	Loc-PG1-0103	Profils
6529	26/10/06	Demsa Mbila	Bénoué	Nord	1	2	2	A
5508	24/08/99	Mokolo Dogba	Mayo Tsanaga	Extrême Nord	1	2	2	A
5583	01/04/00	Mokolo Gabassa	Mayo Tsanaga	Extrême Nord	1	2	2	A
5527	12/04/00	Kaélé	Mayo Kani	Extrême Nord	1	2	2	A
5565	15/03/02	Waza	Logone et Chari	Extrême Nord	1	2	2	A
5939	31/10/05	Figuil	Mayo Louti	Nord	1	2	2	A
6556	26/10/89	Djalingo	Bénoué	Nord	1	2	2	A
6632	01/01/68	Afadé	Logone et Chari	Extrême Nord	1	4	3	B
5477	29/09/99	Mokolo Dogba	Mayo Tsanaga	Extrême Nord	3	2	2	C
6614	30/11/07	Nassarao	Bénoué	Nord	4	1	4	D
6293	13/07/06	Waza	Logone et Chari	Extrême Nord	4	3	4	E
5687	28/07/06	Badjouma-Centre	Bénoué	Nord	4	3	5	F
6019	16/02/06	Badjouma-Radier	Bénoué	Nord	4	3	5	F
6532	09/11/06	Guider Boko	Mayo Louti	Nord	4	3	5	F
6559	18/02/07	Pitoea	Bénoué	Nord	4	3	5	F
6005	01/12/05	Lagdo	Bénoué	Nord	4	3	5	F
6008	05/12/05	Lagdo	Bénoué	Nord	4	3	5	F
314	23/10/86	Touroua	Bénoué	Nord	4	4	3	G
6555	10/09/06	Veau Lanavet	Bénoué	Nord	4	4	3	G
2024	23/02/88	Ndao	Bénoué	Nord	4	4	3	G

Tableau III.1 : souches de MmmSC étudiées et leur origine.

Les chiffres des colonnes Loc-PG1-0001, Locus TR34 et Loc-PG1-0103 représentent les numéros d'allèles de ces locus.

III .2.2. Choix des locus, amplification, électrophorèse et séquençage

Cette étude a porté sur 4 locus. Les locus Loc-PG1-0001 et Loc-PG1-0103 avaient montré une grande variabilité des souches de l'Afrique centrale. Les locus TR34 analysés en VNTR a également montré une grande variabilité avec les mêmes souches. Le locus TR39, bien que peu variable (C Janis, 2006), a cependant été analysé. La liste des amorces utilisées et leur position sur le génome de PG1 figurent dans le tableau n° III.2 ci-dessous. L'amplification a été effectuée avec le thermocycleur de marque EppendorfTM Mastercycler 5330 plus.

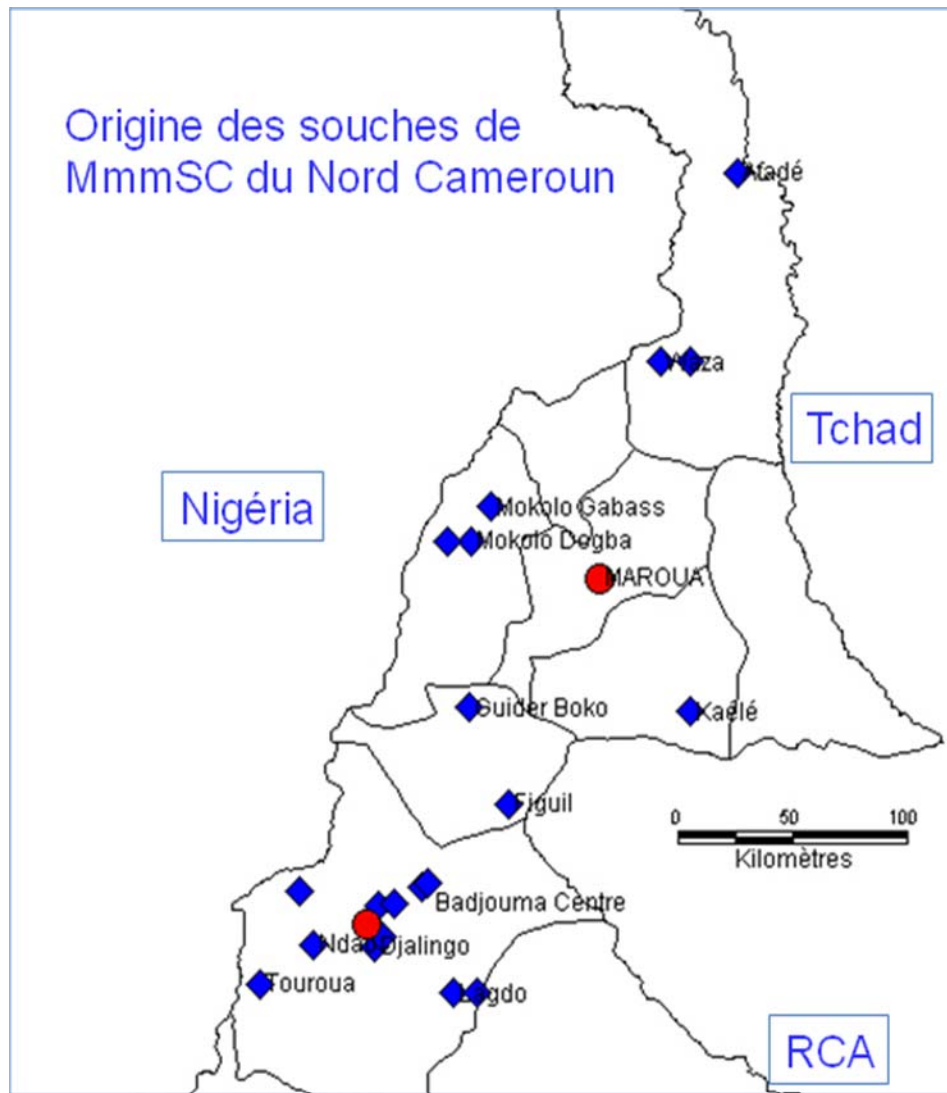


Figure III.1 : Origine des souches de MmmSC isolées au Cameroun.
 En dehors de la souche Afadé isolée par le laboratoire de Farcha (N'djamena), toutes les autres souches ont été isolées par le LANAVET.

Après contrôle de l'amplification sur gel d'agarose à 1 %, les produits de PCR ont été expédiés à Cogenics (Meylan, France) pour être séquencés avec les amorces correspondantes. Les produits de PCR des locus TR34, TR39 et TF1 sont à nouveau séparés sur un gel d'agarose à 5% (agarose Nusieve et Seakem) dans le tampon TAE afin d'observer la différence de taille des fragments amplifiés. Les résultats de séquençage reçus de Cogenics sous forme électronique (fichiers MultiFasta et ABI) sont analysés comme décrits au chapitre II. La nomenclature des différents allèles utilisée dans le chapitre II a été conservée. Ainsi, lorsque sur un locus, les allèles 1, 3 et 4 par exemple ont été décrits (et non 1, 2 et 3), cela

indique que l'allèle n° 2 tel que défini dans le chapitre II n'a pas été retrouvé sur ce locus parmi les souches de l'échantillon.

Locus	Amorces	Position sur PG1	Séquences (5'-3')	Taille de l'amplifiat (pb)
Loc-PG1-001	Loc-PG1-0001-F	1272	AACAAAAGAGATCTTAAATCACACTTTA	538
	Loc-PG1-0001-R	1809	CCTCTTGTTTAACTTCTAGATCAGAAT	
Loc-PG1-0103	TR FT1S	122328	TTTTTGCGATTTTCAGGTCTT	285
	TR FT1R	122612	TTGAGCCAACAGCAGTAAATG	
Loc-TR34	Eh Ch TR34L	451975	ATTCAAATGTAACCAATCAGC	261
	Eh Ch TR34R	452235	GATTGCTTTGATTAACCTTGTG	
Loc-TR39	Eh Ch TR39L	748593	ACATTGATGCTTCATTAAACTG	194
	Eh Ch TR39R	748785	AGACTGAAAACATAAAAAGTGAAC	

Tableau III.2: séquences des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage. La position des amorces sur le génome de PG1 figure dans la 3^è colonne.

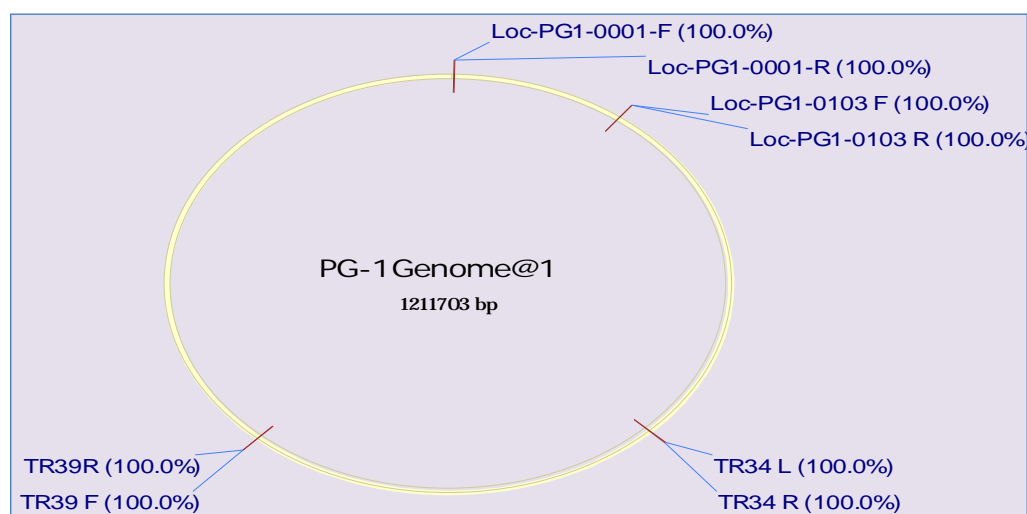


Figure III.2: Position des locus analysés sur le génome de la souche de référence PG1. La position des amorces sur le génome de PG1 a été dessinée avec le logiciel Vector NTI. TR34 et TR39 sont des locus MLVA et Loc-PG1-0001 et Loc-PG1-0103 des locus MLSA.

III.3. RESULTATS.

III.3.1. Les allèles du locus VNTR TR39

Sur gel d'agarose à 5%, les produits de PCR avaient apparemment la même taille ; Ce qui indique une absence ou une faible variabilité des souches sur ce locus en nombre de répétitions. Les résultats d'électrophorèse ont été par la suite confirmés par séquençage. Il n'y avait aucune différence sur les 20 souches analysées. Ce locus est caractérisé par la présence d'une séquence de 9 bases répétée en tandem (5-ATTATTTTT-3'). Cet oligonucléotide est répété 4 fois chez l'ensemble des souches analysées. Ce profil diffère de celui de la souche de référence PG1 qui ne possède que trois répétitions. Ce marqueur étant peu variable, il présente peu d'intérêt pour le typage des souches de MmmSC.

III.3.2. Les allèles du locus VNTR TR34.

Sur gel d'agarose à 5%, une différence assez nette des tailles de fragments était visible. Les souches pouvaient être réparties en 4 groupes ou allèles:

- allèle 1 : la souche 6614 (Nassarao) isolée en 2007 ;
- allèle 2 : la souche 5477 isolée à Mokolo en septembre 1999 ;
- allèle 3 : comprend 7 souches isolées pour la plupart dans la province du nord ; Une seule souche (6293) isolée à Waza en juillet 2006 provient de la province de l'extrême nord ;
- Allèle 4 : comprend les vieilles souches Ndao, Touroua et Afadé qui datent de plus de 20 ans. La souche 6555 isolée d'un veau dont la mère avait été inoculée avec la souche 8740-Rita (qui dérive de la souche Touroua) possède également cet allèle.

Les résultats du séquençage ont confirmé les observations sur gel d'agarose à 5 %. Le polymorphisme porte sur le nombre de répétition d'un fragment de 12 nucléotides (5' AATAACAATAAT-3') dans le gène *natA*. Ce qui entraîne dans la séquence protidique, une répétition de l'acide aminé Asparagine. Le nombre de répétition de l'oligonucléotide varie de 6 à 10. La souche de référence possède 8 répétitions comme les souches Touroua ou Ndao.

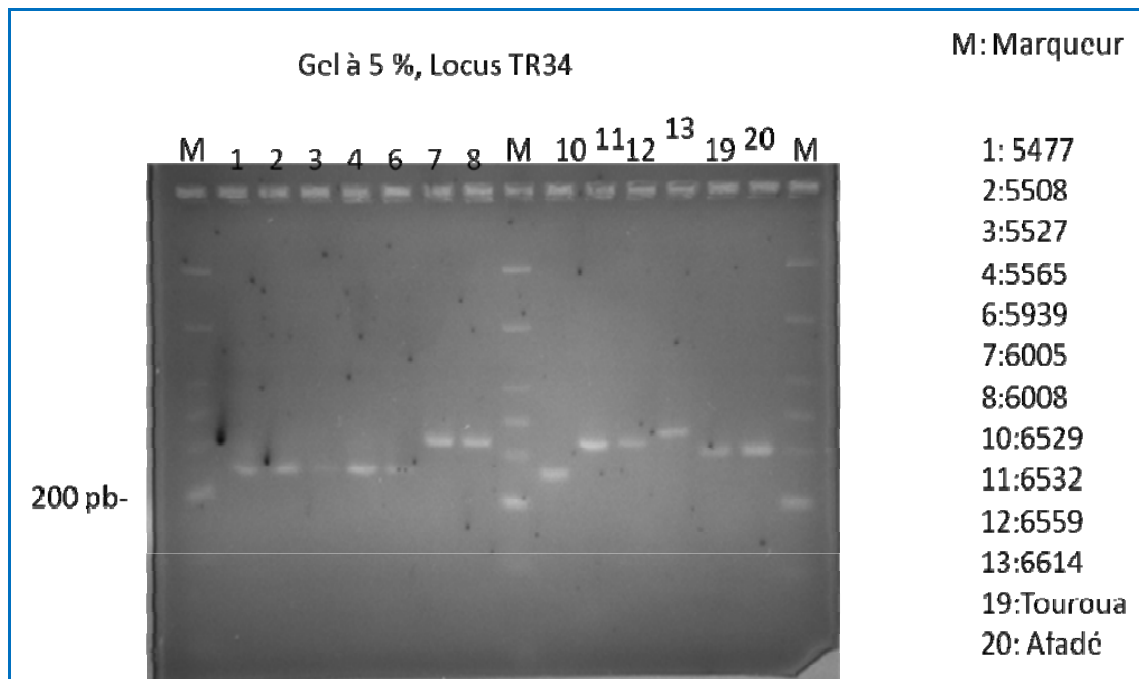


Figure III.3 : Migration sur gel d'agarose à 5 % des échantillons amplifiés sur le locus TR34.
La liste des échantillons figure à droite de la photo. M : marqueur 100 bp de Biolabs.

```

CMR_5508_TR34 TAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_5565_TR34 TAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_5939_TR34 TAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_6529_TR34 TAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
PG1-TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_2024_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_8740_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_6005_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_6008_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_6532_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_6559_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT
CMR_6614_TR34 TAATAATAACAATAATAACAATAATAATAACAATAATAATAACAATAAT-----AATATTCAATCAGTTAAT

```

Figure III.4 : Alignement partiel des séquences de quelques souches sur le locus VNTR TR34.

La séquence de PG1 a été incluse dans cet alignement pour comparaison. Le polymorphisme porte sur des répétitions en tandem d'un oligonucléotide de 12 paires de bases. Le nombre de répétition varie de 6 à 10.

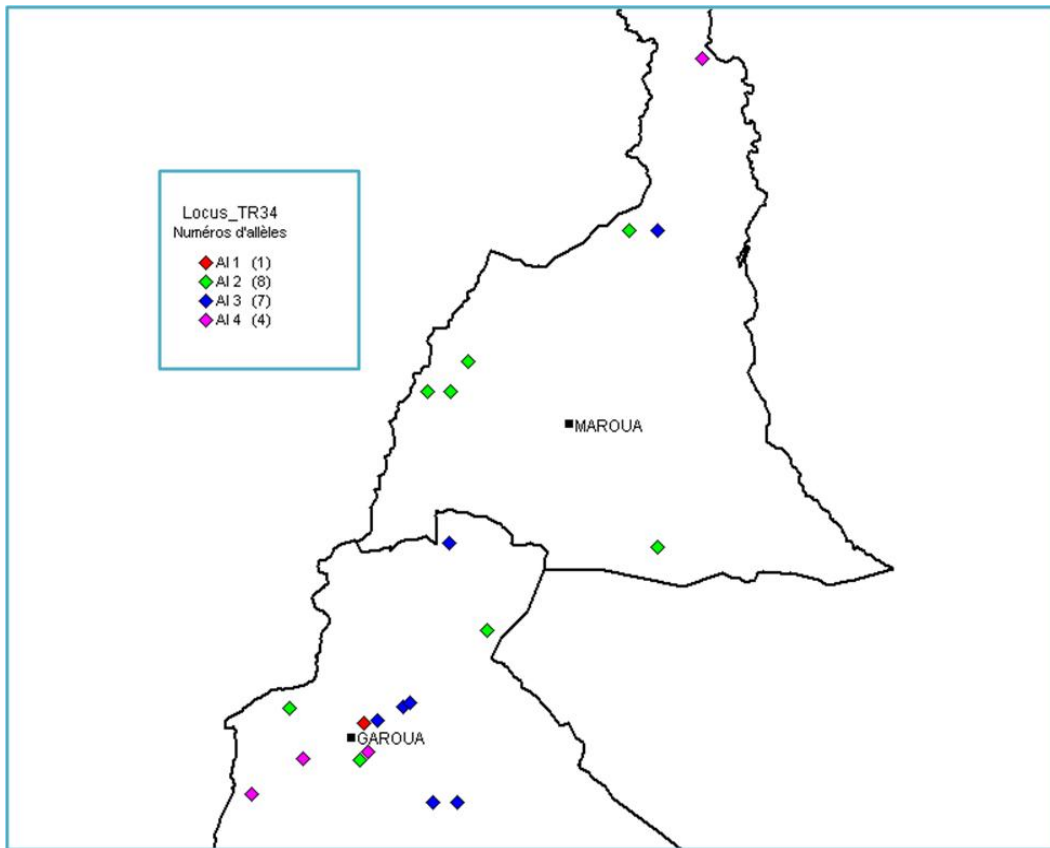


Figure III.5 : carte de la distribution des allèles du locus TR34 au Nord-Cameroun. L'allèle 1 est retrouvé sur une seule souche isolée près de Garoua. L'allèle 2 est retrouvé sur 8 souches au Nord et Extrême Nord. L'allèle 3 est retrouvé sur les souches du Nord et sur une souche isolée à Waza. Les vieux isolats de Touroua, Ndao et Djalingo portent l'allèle n° 4.

III.3.3. Les allèles du locus Loc-PG1-0001.

Trois allèles ont été identifiés sur le locus Loc-PG1-0001. Huit souches isolées dans les deux régions (5 dans l'Extrême-Nord et 3 dans le Nord) possèdent l'allèle n° 1. L'allèle n° 3 est retrouvé sur une seule souche isolée à Mokolo en 1999. L'allèle 4 est retrouvé sur 11 souches dont 10 isolées dans le Nord. La 11^e souche provient de Waza dans l'Extrême-Nord. Les vieux isolats Touroua et Ndao possèdent le même allèle 4. Le polymorphisme observé porte sur des mutations ponctuelles: changement d'un **T** en **A** à la position 1524 et d'un **G** en **A** à la position 1530 de PG1.

5477_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
5508_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
5527_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
5565_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
5583_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
5939_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6529_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6556_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6005_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6008_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6293_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6532_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6559_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6614_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6555_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
6019_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
5687_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA
2024_Loc-PG1-0001	TAATTTAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGAAATAGTAATATATAACAAACCCA

Figure III.6: alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0001.

Les numéros à 4 chiffres à gauche désignent les identifiants des souches. Trois allèles sont identifiés sur ce locus.

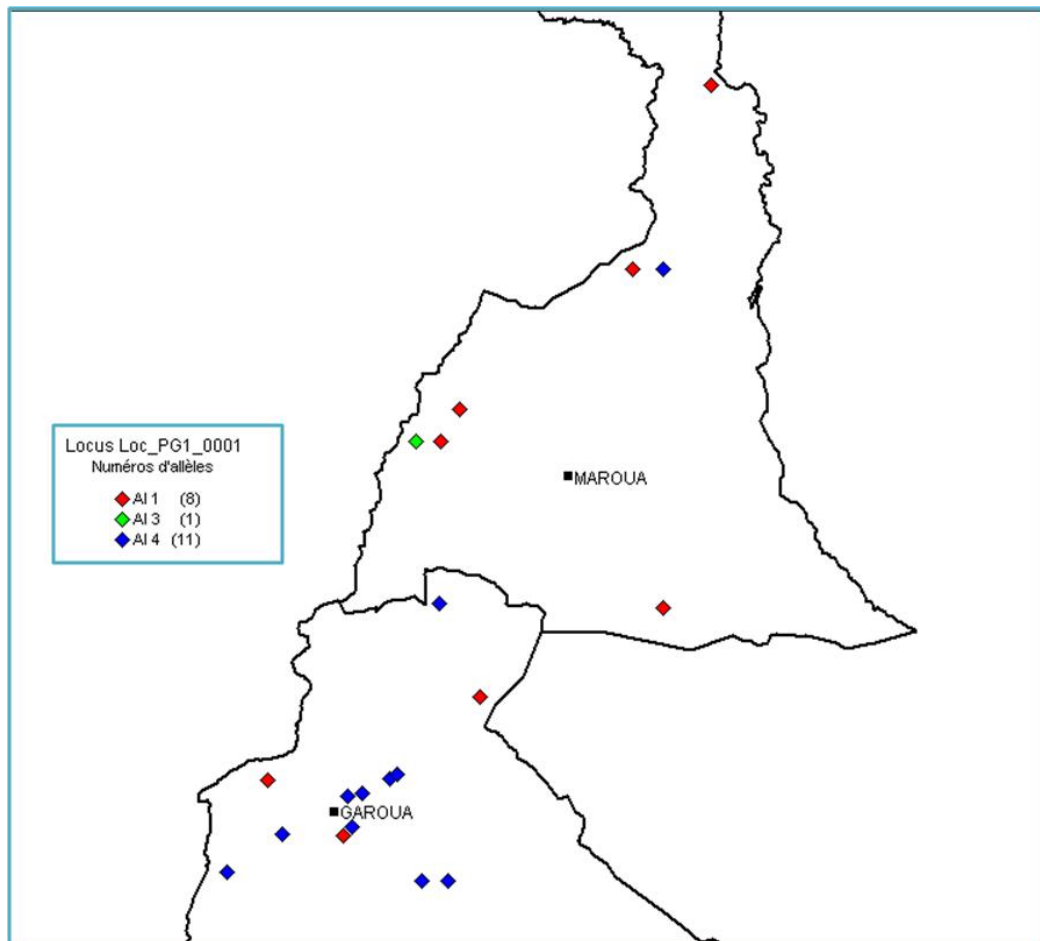


Figure III.7 : carte de la répartition des allèles du locus Loc-PG1-0001 au Nord-Cameroun. Trois allèles ont été identifiés : l'allèle 1 dans les deux régions, l'allèle 3 sur une souche isolée à Mokolo et l'allèle 4 sur les souches du nord et de Waza.

III.3.4. Les allèles du locus Loc-PG1-0103.

Sur gel d'agarose à 5 %, il est possible d'apercevoir une différence de tailles entre les différents fragments mais la précision est médiocre. Elle ne permet pas de regrouper les différentes souches entre elles. Le polymorphisme porte sur le nombre de répétitions en tandem, du triplet TTA dont le nombre varie de 6 à 9. Les résultats du séquençage nous ont permis de distinguer quatre allèles différents sur ce locus.

- Allèle 2 : se retrouve sur huit souches ayant 6 TTA
- Allèle 3 : 4 souches : Afadé, Ndao, Touroua et Veau Lanavet. En dehors de la souche isolée du veau en expérimentation, ce sont des vieilles souches de plus de 20 ans. Elles portent chacune 7 TTA.
- Allèle 4 : la souche 6614 (Nassarao) possède 8 TTA.
- Allèle 5 : regroupe 6 souches provenant toutes de la province du Nord ayant 9 répétitions du triplet TTA.

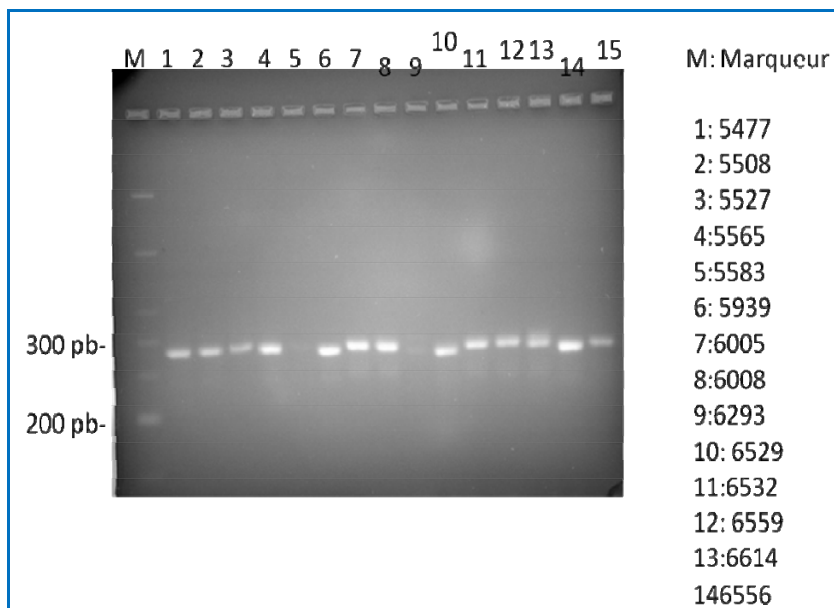


Figure III.8 : migration sur gel d'agarose à 5 % des échantillons amplifiés sur le locus Loc-PG1-0103.

Sur ce gel d'agarose à 5%, on distingue la différence de taille entre les différents fragments, mais il n'est pas possible sur ce gel d'estimer la taille et de regrouper les souches en allèles sur la seule électrophorèse. Les bandes n'étant pas visibles sur les échantillons 5583 et 6293, l'amplification a été reprise.

CMR_5687_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6005_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6008_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6019_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6559_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6532_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6614_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6555_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_2024_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMP_5477_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_5508_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_5527_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_5565_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_5583_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_5939_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6529_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
CMR_6556_FT1	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG
PG1_Loc-PG1-0103	ATCAATAACTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAGTATTAATTCAG

Figure III.9 : alignement partiel des séquences sur le locus Loc-PG1-0103.

Le site polymorphe est caractérisé par des séquences (TTA) répétées en tandem. Le nombre de triplets répétés varie de 6 à 9. Un triplet répété sur deux est colorié en bleu pour une meilleure visualisation.

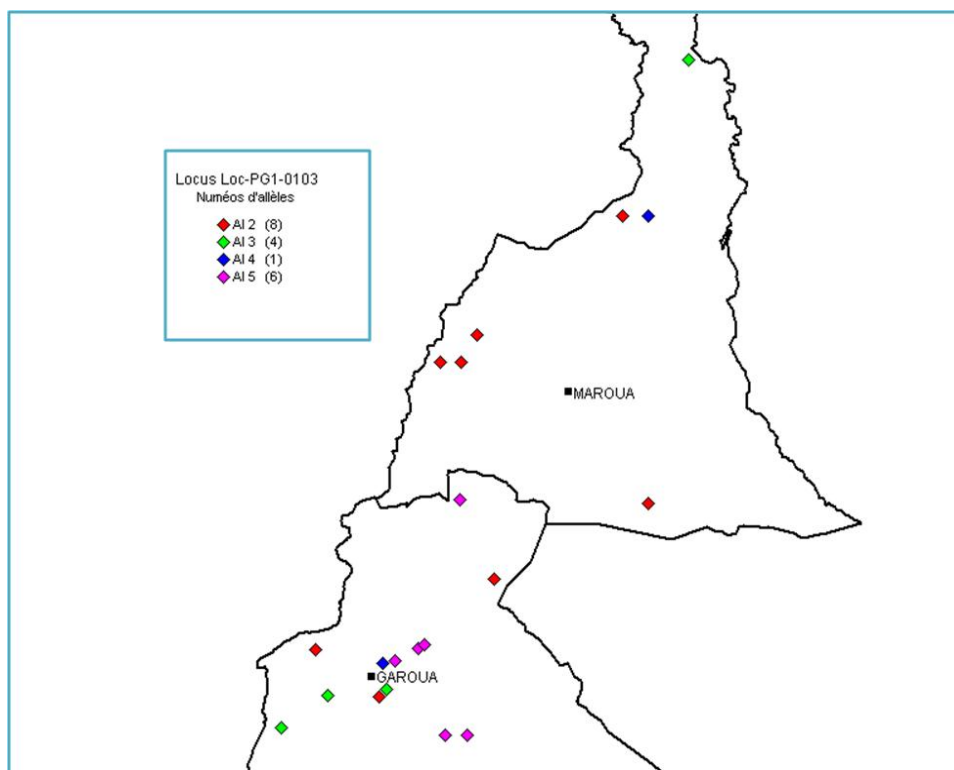


Figure III.10 : carte de la distribution des allèles du locus Loc-PG1-0103.

Quatre allèles ont été identifiés. L'allèle 2 est rencontré dans les deux provinces. L'allèle 3 est rencontré uniquement sur les anciennes souches (Ndao, Touroua, Afadé) et sur la souche du veau du LANAVET. L'allèle 4 est retrouvé sur deux souches (Nassarao et Waza). L'allèle 5 se retrouve essentiellement dans la province du Nord.

III.3.5. Analyse des différents profils observés.

La compilation des résultats des trois locus (Le locus TR39 n'étant pas utilisable) a permis la définition des profils. Les souches ayant les mêmes allèles sur les trois locus sont classées dans un même profil. En définitive, nous avons identifié sept profils alléliques différents de MmmSC qui circulent ou qui ont circulé dans les régions du Nord et de l'Extrême-Nord depuis 1968 :

- Le Profil A : le plus fréquent, avec 7 souches isolées aussi bien dans le Nord que dans l'Extrême-Nord. La plus ancienne souche a été isolée à Djalingo, près de Garoua en 1989. La plus récente en 2006 à Demsa-Mbilla ;
- Le profil B: comprend une seule souche Afadé isolée en 1968 par le laboratoire de Farcha (Ndjamena, Tchad) ;
- Le profil C : comprend une souche venant du département de Mayo-Tsanaga dans l'Extrême-Nord, près de la frontière nigériane ;
- Le profil D : est constitué du dernier isolat (Nassarao) qui date de novembre 2007 et dont le profil diffère de celui des autres souches ;
- Le profil E : est constituée d'une souche de Mokolo (Département de Mayo-Tsanaga) datant de septembre 1999 ;
- Le Profil F : compte 6 souches toutes isolées de la province du Nord de 2005 à 2006;
- Le profil G est constitué des vieux isolats de Ndao et Touroua et d'une souche isolée d'un veau né dans un lot de bovins en cours d'expérimentation.

La souche 6614 (Nassarao) a un profil différent des souches isolées jusque là dans la région. Apparemment, elle semble être d'introduction récente au nord Cameroun. Le foyer de Nassarao ne serait pas une contamination à partir des anciens foyers (Pitoe, Ngong, Badjouma ou Demsa Mbilla) plus ou moins maîtrisés.

Dans l'Extrême-Nord, les deux foyers de Mokolo Dogba ont été signalés à un mois d'intervalle, les prélèvements étant parvenus au laboratoire les 24 août et le 29 septembre 1999. Mais les souches isolées diffèrent sur le locus Loc-PG1-0001. Ces deux foyers n'auraient donc pas de rapports entre eux et il s'agirait plus tôt d'une émergence à partir de deux sources de contamination différentes. Aucune enquête n'ayant été menée à cette époque, la source de contamination n'a pas été déterminée.

De même à Waza, deux souches ont été isolées en 2002 et en 2006 respectivement. Ces deux isolats diffèrent sur les trois locus analysés. Là aussi, il ne s'agirait pas d'une contamination du foyer de 2002 mal contrôlé qui aurait connu une résurgence en 2006.

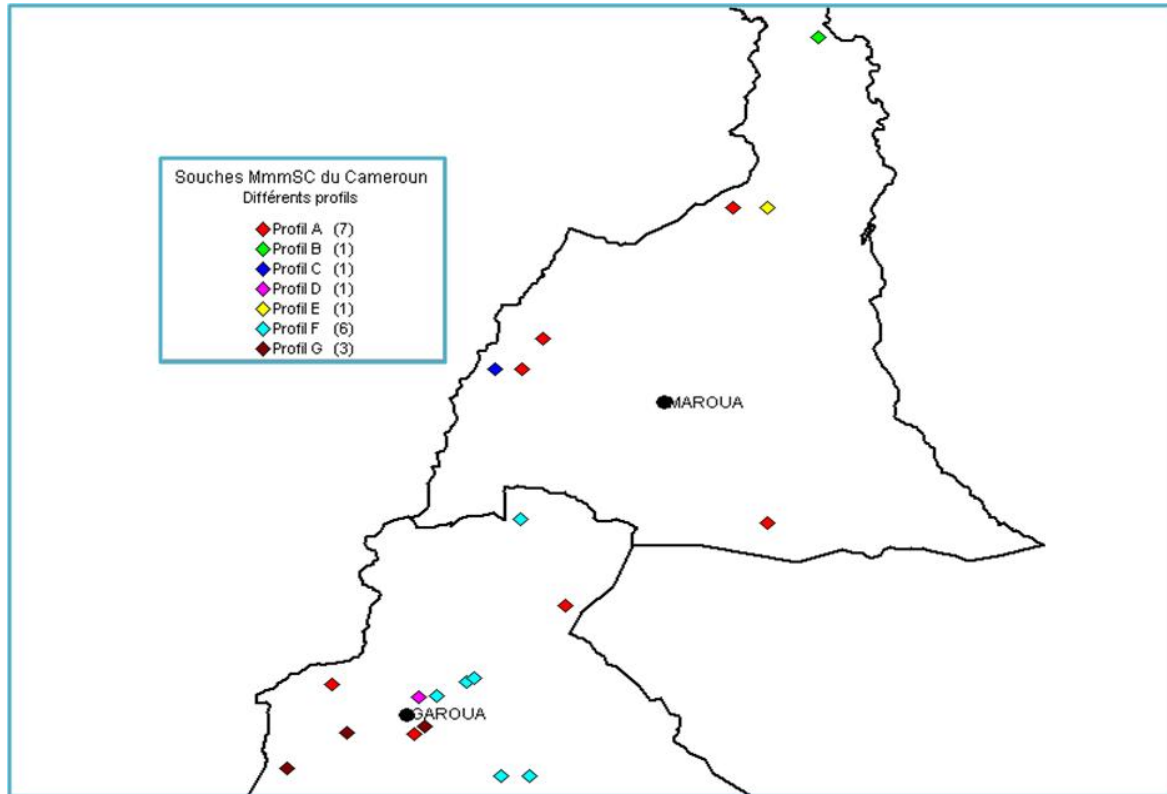


Figure III.11 : carte de la distribution des différents profils alléliques. Sept profils alléliques dénommés de A à G ont été définis. Le profil A, le plus vaste avec 7 souches, est rencontré dans les deux provinces. Le profil F se retrouve sur six souches isolées dans la province du Nord. Le profil G compte trois souches (les vieux isolats de Touroua, Ndao et la souche isolée du veau du LANAVET). Les autres profils se retrouvent sur une seule souche chacune (B, C, D, E)

De Lagdo, deux prélèvements des localités voisines sont parvenus au laboratoire à 5 jours d'intervalle en décembre 2005. Les souches isolées (6005 et 6008) présentent le même profil sur les trois locus analysés. Il s'agirait de la même souche qui aurait infecté par la suite les élevages de Pitoa, Guider-Boko, Badjouma-Centre et Badjouma-Radier, localités situées toutes dans un rayon de 70 km.

III.3.6. Les mouvements du bétail au nord Cameroun et la situation des foyers.

La circulation du bétail d'une région à une autre est réglementée. L'arrêté du 20 juillet 1988 définit les pistes à bétail qu'empruntent les troupeaux de bovins en direction des grands

marchés du Nord (Adoumri, Pitoa, Ngong) ou de l'Extrême-Nord ou pour accéder au marché des provinces méridionales. La plupart des foyers qui ont été confirmés sont situés sur les pistes à bétail ou à proximité de celles-ci (carte n° III.12). La distribution de certains profils alléliques et le confinement de certains autres seraient liés aux grands mouvements de bétail. Les principaux marchés de la province du nord (Ngong, Mbaïmboum, Pitoa) sont ravitaillés par des animaux en provenance de Mayo-Rey, de la Bénoué mais aussi du Tchad et de la République Centrafricaine. Les animaux vendus sur ces marchés sont convoyés vers Garoua, Guider, Mayo-Oulo ou vers le Nigeria. C'est sur ces axes que les souches du profil allélique F ont été identifiées : La souche originelle serait partie de la zone de Lagdo vers Guider et à dû infecter les troupeaux de Pitoa et Badjouma. L'émergence des foyers de Lagdo, avant les autres, conforte cette hypothèse.

Les mouvements de faible amplitude sont observés au niveau des zones frontalières (région de Touroua, Demsa ou Mokolo et dans la plaine du Logone et Chari) à l'occasion de la transhumance. Ces mouvements sont aussi causés par l'insécurité que des rebellions des pays voisins ou les « coupeurs de route » (brigands) entretiennent dans la région: ces mouvements de faible amplitude pourraient expliquer qu'un profil allélique donné ne se retrouve pas dans d'autres localités : profils G à Touroua et Ndao, profil C à Mokolo et profil E à Waza.

III.3.7. Efficacité des mesures de lutte.

Le typage moléculaire offre un moyen d'appréciation de l'efficacité des mesures de lutte entreprises pour venir à bout d'un foyer de maladie. En cas d'un nouveau foyer, il est essentiel de savoir s'il s'agit d'une résurgence d'un ancien foyer mal maîtrisé ou de l'émergence d'une nouvelle épizootie. Les cas des foyers du nord Cameroun nous donnent une belle illustration.

Dans le profil F, des souches ont été isolées à Lagdo (décembre 2005), Badjouma-Radier (février 2006), Badjouma-Centre (juillet 2006) et Guider-Boko (novembre 2006). La circulation de la souche dans un rayon de 70 km pendant au moins 18 mois avant une probable extinction (ou arrêt de la surveillance) démontre l'insuffisance des mesures de lutte qui avaient été entreprises. Badjouma Centre et Badjouma Radier sont à 5 km l'un de l'autre. Les mesures de cantonnement, de vaccination autour du foyer et éventuellement d'abattage auraient pu épargner Badjouma-Centre six mois après le foyer de Badjouma-Radier. Des mesures de cantonnement avaient certes été décidées lors des foyers de Pitoa et Badjouma (entretiens avec Dr Bakary Gambo, Services vétérinaires de la Bénoué). Mais les propriétaires

des animaux malades se seraient enfuis plus au nord et auraient été à l'origine du foyer de Guider-Boko (figure III.1). Une enquête effectuée à posteriori a montré pour le cas du profil F qu'il y a une concordance entre les résultats du typage qui regroupent les souches de Lagdo, Pitoa, Badjouma et Guider-Boko dans le même type et la situation épidémiologique sur le terrain. Ces souches du profil F proviendraient d'une expansion clonale à partir d'un même foyer.



Figure III.12 : carte des pistes à bétail dans le Nord et Extrême-Nord.

Pistes à bétail selon l'arrêté ministériel du 02/MINEPIA du 20 juillet 1988. PN1 : piste nationale n° 1. Les mouvements du bétail se font surtout de l'est vers l'ouest. Les grands marchés à bétail (Adoumri, Bogo, Gobo, Ngong) sont signalés par une étoile rouge (★) sur la carte. Carte modifié à partir de GSEP (GSEP, 2003).

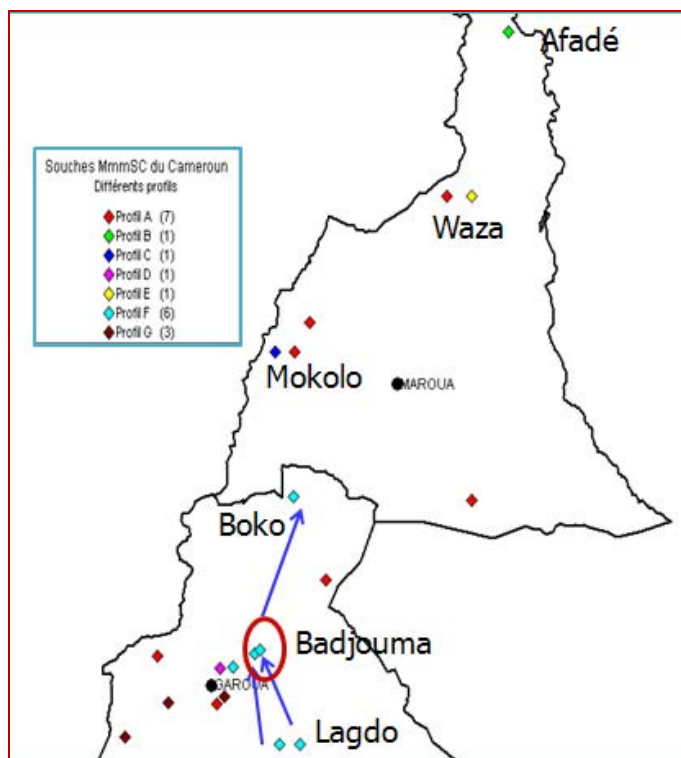


Figure III. 13 : Carte de circulation probable du profil F dans le Nord.

Le premier foyer serait parti de Lagdo. Les services vétérinaires ont défini une zone de pâturage et de points d'eau pour les troupeaux atteints (cercle rouge). Mais les éleveurs se seraient enfuis vers le nord et seraient à l'origine du foyer de Guider-Boko.

III.4. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Le locus TR39 ne présente pas de variabilité sur les 20 souches étudiées. C. Janis (Janis C., 2006) avaient observé très peu de variabilité sur des souches d'origine géographique plus vaste. Ce locus présente très peu d'intérêt pour des études épidémiologiques ou pour le typage des souches de MmmSC. Les trois autres locus (locus TR34, Loc-PG1-0001 et Loc-PG1-0103) avaient entre 3 et 4 allèles différents. Le locus TR34 correspond au VNTR 4 de McAuliffe (2008) qui avait identifié 9 types alléliques différents dans un échantillon de 39 souches. Sur 51 souches déjà analysés avec TR34, nous avons identifié 12 profils différents. Ce qui prouve une variabilité certaine de ce marqueur. Cette variabilité est confirmée avec une vingtaine de souches d'origine géographique restreinte. La stabilité de marqueur qui avait été vérifiée avec les différents passages de la souche 8740-Rita (1^{er}, 11^{ème} et 53^{ème} passages), s'est à nouveau vérifiée avec le passage de la même souche sur le veau du LANAVET. Ce locus peut être utilisé dans un laboratoire ayant peu d'équipements mais en mesure d'effectuer une amplification et une séparation sur gel d'agarose à 5 %. Les autres outils de biologie moléculaire demandent la mise en œuvre des moyens plus lourds (le séquençage) ou la sous-traitance de certaines opérations à des compagnies privées très peu représentées sur le continent africain. Le locus Loc-PG1-0103 est également variable au niveau des souches

isolées au Cameroun. La distribution des allèles de ce locus semble corrélée avec la situation géographique des foyers : ainsi toutes les souches de l'allèle 5 se retrouvent dans la province du nord et correspondent au profil global F. De même l'allèle 3 correspond aux souches plus anciennes Ndao et Touroua (profil G) et l'allèle 2 est plus ubiquiste.

La principale conclusion de notre étude est qu'il existe un polymorphisme assez important au niveau des souches de MmmSC qui circulent au Nord-Cameroun. Ce polymorphisme peut être détecté avec un nombre de marqueurs assez faible (3) et pour l'un d'entre eux le polymorphisme peut être observé par électrophorèse, ce qui limite le coût du typage. Ce résultat n'est pas surprenant en soi puisque la PPCB sévit de façon enzootique dans cette zone depuis des temps immémoriaux et que les flux de bétail en provenance des pays voisins entretiennent ce polymorphisme. Il est donc possible de réaliser des études d'épidémiologie moléculaire à un niveau géographique relativement restreint et ainsi d'analyser le mode de diffusion de la maladie à l'aide de ces outils de typage.

Cependant, les résultats obtenus dans cette étude l'ont été avec un échantillonnage de souches qui n'avait pas été optimisé. Il serait important que le réseau d'épidémiosurveillance intègre dans ses objectifs une récolte optimisée de souches pour un suivi à long terme de la PPCB au Cameroun. Il conviendrait d'essayer de confirmer si oui ou non la région de l'Adamaoua est indemne de PPCB ou non. Ce qui pourrait se faire par des enquêtes sérologiques ciblées au niveau des zones de suspicion et par des suivis au niveau des abattoirs. Si des souches de MmmSC sont isolées, leur typage pourrait éventuellement apporter des informations intéressantes sur le plan épidémiologique (origine des foyers). Si le statut « indemne de PPCB » est confirmé, cela serait une très bonne nouvelle car ce serait une situation particulièrement rare en Afrique intertropicale pour une zone propice à l'élevage bovin. Dans les autres régions du Cameroun, il faudrait recueillir régulièrement des échantillons dans toutes les zones où sévit la PPCB afin d'évaluer s'il existe des tendances évolutives au cours du temps. Le recueil de données épidémiologiques associées aux souches serait également primordial afin de pouvoir évaluer leur pouvoir pathogène et/ou tester leur sensibilité aux antibiotiques.

Sur un plan plus général, il est clair que le Cameroun a connu, ces dernières années, une recrudescence de la PPCB. Cette recrudescence s'est opérée à la faveur de la cessation de la lutte contre la peste bovine avec l'engagement du Cameroun sur la voie OIE. La lutte contre la PPCB avait bénéficié de l'emploi des vaccins bivalents peste bovine-péripleurésie mais

aussi de la rigueur sur le contrôle des mouvements d'animaux, la crainte que les éleveurs avaient de la peste bovine. L'évolution insidieuse de la PPCB notamment la forme chronique avec des mortalités faibles lorsqu'elle devient endémique n'incite plus les éleveurs au respect des prescriptions des services vétérinaires.

Au vu de nos résultats, la stratégie de lutte contre la PPCB au Cameroun n'est pas optimisée et qu'elle a du mal à s'adapter aux conditions réelles du terrain. En pratique, il n'est pas possible de restreindre les flux d'animaux, qu'ils soient commerciaux ou bien déclenchés par des troubles de l'ordre public. Dans ces conditions, des campagnes de vaccination réalisées avec les vaccins actuels ne permettront qu'un contrôle partiel de la PPCB, contrôle d'autant plus faible que la couverture vaccinale est partielle. De même, les traitements antibiotiques sont principalement appliqués par les éleveurs eux-mêmes sans que les animaux soient ensuite évacués vers la boucherie. Cela ne peut que renforcer les risques d'apparition d'antibiorésistance qu'il conviendrait de surveiller.

CHAPITRE IV

ETUDE COMPAREE DU POUVOIR PATHOGENE ET DU POUVOIR IMMUNOGENE DES SOUCHES DE MmmSC PAR INOCULATION A DES BOVINS PAR LA VOIE SOUS-CUTANEE

I.1. INTRODUCTION

La lutte contre la péripneumonie contagieuse bovine est basée sur des mesures de police sanitaire et/ou des campagnes de vaccination de masse. Les souches vaccinales T1-44 et T1-SR atténuées de façon empirique (Sheriff et Piercy, 1952) sont très largement utilisées sur le continent africain. Mais elles confèrent une immunité de faible durée nécessitant des campagnes de vaccination répétées afin d'asseoir une bonne protection. L'innocuité de la souche T1-44 ne donne pas non plus entière satisfaction. Les réactions post vaccinales au point d'inoculation, connues sous le nom de « phénomène de Willems » (Willems, 1852), qui surviennent de façon imprévisible peuvent toucher jusqu'à 11 % d'animaux vaccinés (Lindley, 1971) et obliger les vétérinaires à recourir à un traitement antibiotique trois semaines après la vaccination. L'origine du phénomène de Willems n'est pas encore bien élucidée. Elle pourrait être due soit à un pouvoir pathogène résiduel de la souche T1-44 (souche non suffisamment atténuée), soit la conséquence d'une réversion de la souche à la virulence (Wesonga et al., 2003). Mbulu et collaborateurs ont montré que la souche pouvait induire des lésions typiques de PPCB lorsqu'elle est administrée par la voie endo-bronchique à des animaux réceptifs (Mbulu et al., 2004).

La recherche des nouveaux vaccins, plus immunogènes et si possible dépourvus de tout pouvoir pathogène résiduel, passe par une meilleure connaissance des mécanismes de virulence des souches de MmmSC et de la réponse immunitaire induite chez l'hôte qui conduit soit à la maladie, soit à la protection. Il existe peu d'études récentes sur les mécanismes du pouvoir pathogène des souches de MmmSC (Pilo et al. 2007). La plupart prennent comme axiome de départ que les souches de MmmSC isolées en Europe après 1982 sont peu pathogènes. Comme celles-ci se caractérisent également par une délétion d'un fragment de 8,8 kpb par rapport aux autres souches, il était logique de supposer que des facteurs de virulence devaient se trouver dans ce fragment de 8,8 kpb. Cependant, il convient

d'être plus prudent quant au postulat de départ stipulant que les souches européennes seraient moins virulentes que les souches africaines, pour plusieurs raisons :

- Il est difficile d'établir un degré de virulence sur la base de données de terrain. Les conditions locales sont trop variables d'un éleveur à l'autre et les données recueillies trop parcellaires pour pouvoir tirer des conclusions définitives. Par ailleurs, il faut noter que des lésions typiques et extensives de péripneumonie avaient été observées en Italie dans les années 1990 chez les bovins mais aussi chez des buffles domestiques.

- Il faut également se souvenir que la souche isolée en 1967 dans les Pyrénées Orientales ne possède pas cette délétion de 8,8 kpb et qu'aucune étude n'a montré que les foyers de PPCB de cette époque étaient plus « dramatiques » que ceux des années 80 et 90.

- Il faut noter que la différence de virulence établie entre la souche L2 et la souche Afadé repose essentiellement sur une observation en condition expérimentale dans des conditions de laboratoire haute sécurité et sur un nombre très faible d'animaux. De plus, la différence de virulence a été établie sur la foi de séro-conversion et non pas sur l'observation de lésions (Abdo et al 1998). On sait également par ailleurs que des expérimentations faites avec de faibles nombres d'animaux obéissent à des lois stochastiques et que les résultats peuvent être très variables d'un essai à l'autre (Lesnoff et al. 2002).

- Il existe également en Afrique des observations qui font état de souches moins pathogènes que les autres, notamment quand la maladie a sévi depuis un certain temps dans une zone (Provost et al., 1987). En particulier la souche T1 avait été choisie initialement car elle semblait posséder une virulence moindre. Ainsi, même pour des souches africaines ne présentant pas de délétion, il peut y avoir des variations de virulence. Enfin, les souches vaccinales qui ont été développées par atténuation empirique ne semblent pas différer de façon notable au niveau du système de transport du glycérol.

Ainsi, il est possible que les gènes présents au niveau de la zone de 8,8 kpb participent au pouvoir pathogène des souches mais il est probable que d'autres facteurs interviennent. L'étude de la virulence des souches de MmmSC peut être envisagée par des études de mutagenèse afin d'inactiver sélectivement certains gènes et d'étudier ensuite la virulence résiduelle de ces souches. Encore faudrait-il pouvoir mesurer la virulence des souches de façon reproductible. A l'heure actuelle, les seuls modèles proposés sont des modèles

d'inoculation aux souris et de l'étude de la clairance des mycoplasmes au niveau sanguin. (March et Brodie, 2000 ; Smith, 1968). Ce modèle a l'avantage de la simplicité mais l'inconvénient majeur est que les souris ne sont absolument pas sensibles à MmmSC et qu'elles ne développent aucune forme de réaction inflammatoire. Il semble donc assez difficile d'extrapoler les résultats obtenus avec ce qui se passera chez un bovin.

L'objectif de cette étude était donc de développer un modèle permettant notamment d'évaluer le pouvoir pathogène des souches de MmmSC. Nous avons choisi le modèle d'inoculation par la voie sous-cutanée chez les bovins car elle permet d'observer des signes d'inflammation sans avoir à recourir à des examens invasifs.

IV.2. MATERIELS ET METHODES

IV.2.1. Les animaux.

Les zébus de race Goudali ont été achetés dans l'Adamaoua, région où la péripneumonie contagieuse bovine n'avait pas été formellement diagnostiquée depuis 1972 et que les services vétérinaires considèrent comme indemne de cette maladie. Au moment de l'achat, les animaux avaient entre deux et quatre ans, selon la conformation de leur dentition. Ils ont été acheminés à Garoua par camion. Au total 63 bovins ont été gardés dans les enclos du laboratoire jusqu'au début des expérimentations, soit environ six mois. Avant l'achat, des tests de dépistage de la brucellose (Rose Bengale et fixation du complément) et de la tuberculose (tuberculation comparative) ont été effectués. Ils ont été testés et trouvés négatifs en anticorps anti-péri pneumoniques (fixation du complément et ELISA de compétition), ont été traités à l'arrivée au laboratoire contre les tiques au BUTOXND (Larve, France), contre les helminthiases au BENZALND (Larve, France), contre les trypanosomes au DIMINAPHENEND (Kelai, Belgique) aux doses recommandées par les fabricants. Durant les expérimentations, les animaux ont été traités en cas de besoin contre les ectoparasites. Ils ont été répartis en six groupes de façon aléatoire en utilisant le programme AleaND de MICROSOFTND. Au moment de l'inoculation, deux animaux retenus (134 et 135) qui présentaient des lésions étendues de dermatophilose ont été remplacés par deux autres (142 et 335). Un veau né durant l'expérimentation a été gardé et traité comme contrôle négatif à côté de sa mère. L'alimentation était constituée des herbes fraîches ou du foin, des fanes de haricot, des tourteaux de coton et des drêches de brasseries. L'eau était servie ad libitum.

IV.2.2. Les souches de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC);

Cinq souches de MmmSC obtenues du CIRAD ont été étudiées. La souche 8740-Rita dérive de la souche 8740 (Touroua), isolée de la localité du même nom au Nord-Cameroun en 1986 et qui s'était révélée pleinement pathogène lors de nos précédentes expérimentations (Yaya et al., 1999). La souche 8740-Rita a été re-isolée des poumons d'un animal lors d'une reproduction de la maladie avec la souche d'origine 8740 (Touroua). La souche de référence PG1^T fournie par SVA (Suède), est la même qui a été séquencée (Westberg, 2004). La souche T1B a été isolée au Kenya à partir d'une réaction de Willems à l'occasion d'une vaccination avec la souche T1-44 (Wesonga et Thiaucourt, 2000 ; Wesonga et al, 2003). Les souches T1BBC2 et T1BBC3 qui dérivent de T1B sont deux clones qui ont subi deux passages sur bovins. Ces souches ont été cultivées dans le milieu de Hayfick modifié contenant du pyruvate de sodium et du glucose (Thiaucourt et Di Maria, 1992) pendant 48 heures ; ensuite du lait écrémé a été ajouté (4 ml du lait écrémé pour 20 ml de bouillon de culture) et l'ensemble congelé à -85°C sous forme d'aliquotes de 1 ml. Deux aliquotes de chaque souche ont été titrés avant l'inoculation. Le jour de l'inoculation, un aliquote est repris dans un volume de solution physiologique afin d'obtenir 10⁷ UFC par millilitre (tableau IV.2). Les titres ont été vérifiés tout juste après inoculation aux animaux. La souche T1-44 a été fournie par le laboratoire de production des vaccins du LANAVET (lot n° 017L) sous forme lyophilisé et le flacon a été reconstitué juste au moment d'inoculation.

IV.2 .3. Protocole et suivi expérimental.

Le protocole

Le 2 juin 2005, deux groupes d'animaux ont été inoculés, par la voie sous-cutanée, à la base de l'encolure du côté droit avec 1 ml de la culture diluée (dans du sérum physiologique), contenant 10⁷ UFC. Deux souches ont été utilisées pour cette validation, la souche 8740-Rita comme exemple type d'une souche pathogène et la souche PG1 (stock SVA) qui était supposée non pathogène.

Les souches ont été inoculées par voie sous-cutanée aux bovins du côté droit à la base de l'encolure. Ils ont été suivis pendant un mois. Afin d'éviter les mortalités dans le troupeau, un traitement à l'Oxytétracycline 20 % (longue action) était décidé chaque fois que les lésions de Willems menaçaient la vie d'un animal.

En parallèle, des animaux ont été inoculés de la même manière avec les souches T1/44, T1B, T1BBC2 et T1BBC3.

A l'issue de cette première série d'inoculation, visant à évaluer le pouvoir pathogène des souches, une deuxième inoculation a été effectuée (29/07/2005) avec la souche 8740-Rita, 15 jours après la fin de la première expérience et le traitement des animaux avec une injection de tétracycline longue action. Un lot d'animaux naïfs a été introduit pour valider le protocole. La souche a cette fois-ci été inoculée du côté gauche de l'encolure. L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer cette fois-ci le degré de résistance des animaux face à une souche au pouvoir pathogène établi et donc d'évaluer le pouvoir immunogène des souches initialement utilisées.

Prise de températures

Les températures rectales ont été mesurées chaque matin entre 7 H30 et 9H00. Avant l'inoculation, quatre mesures de températures ont été effectuées afin d'obtenir la « température moyenne normale » pour chaque animal, et aussi habituer les animaux à la manœuvre.

Suivi de la réaction inflammatoire au point d'inoculation.

La réaction inflammatoire au point d'inoculation a été mesurée chaque jour à l'aide d'un pied à coulisse. Lorsque cette inflammation dépassait 20 cm, la mesure était effectuée à l'aide d'une ficelle et ensuite reportée sur une règle graduée. Les mesures ont été effectuées sur les plans horizontal et vertical.

Index de pathogénicité.

Afin de comparer les résultats d'un groupe à l'autre, le système de notation des lésions, semblable à celui de Hudson et Turner a été adopté (Hudson and Turner, 1963) en tenant compte de l'étendue des œdèmes et la durée de la fièvre comme suit :

Nombre de jours avec fièvre :

- Absence de fièvre : 0
- 1 à 2 jours de fièvre : 1
- 3 à 4 jours de fièvre : 2
- Plus de 4 jours de fièvre : 3

Taille maximale des œdèmes :

- Absence de réaction : 0
- Réaction jusqu'à 20 cm : 1
- Réaction de 20 à 40 cm : 2
- Réaction de plus de 40 cm : 3

Le score final pour chaque animal était la somme des deux facteurs, ce qui donnait donc un index individuel compris entre 0 et 6.

Sérologie

Afin de comparer les résultats sérologiques de différents groupes et aussi dans le cadre de la validation d'un nouveau test ELISA basé sur l'antigène LppQ, des prises de sang ont été effectuées une fois par semaine et les sérums analysés en ELISA de compétition (Le Goff et Thiaucourt, 1998) et en ELISA indirecte avec l'antigène LppQ (Bruderer, 2002) selon les protocoles des fabricants (Institut Pourquier, France ; Bommeli Diagnostics, Suisse). Les résultats ont été lus à l'aide d'un filtre de 450 nm avec le lecteur ELISA Titertek Multiscan plus MKII (Flow Laboratories, Finlande). Les résultats en ELISA indirecte LppQ sont exprimés en pourcentage de positivité (PP) calculés selon la formule :

$$PP = (OD_{\text{éch}} - OD_{\text{nég}}) * 100 / (OD_{\text{pos}} - OD_{\text{nég}})$$

où $OD_{\text{éch}}$, OD_{pos} et $OD_{\text{nég}}$ représentent la densité optique de l'échantillon, du contrôle positif et du contrôle négatif. Les seuils de positivité de 35 % (ELISA LppQ) et 50 % (C-ELISA) indiqués dans les notices d'utilisation des kits ont été retenus.

Les résultats en C-ELISA ont été exprimés en PI (pourcentage d'inhibition) calculé selon la formule suivante :

$$PI = 100 * (DO_{\text{Mab}} - DO_{\text{Ech}}) / (DO_{\text{Mab}} - DO_{\text{CC}})$$

où DO_{Ech} , DO_{CC} et DO_{Mab} représentent respectivement les densités optiques de l'échantillon, du contrôle conjugué et du contrôle monoclonal.

IV.3. RESULTATS

IV.3.1. Résultats du titrage des souches utilisées.

Les résultats du premier titrage des souches figurent dans le tableau IV.1:

Souches	Nombre de colonies à la dilution 10^{-5}	Titre /ml (en log10)	Dilution de la culture utilisée
PG1	64	8.5	1/31
T1BB-C2	163	8.9	1/79
T1BB-C3	220	9.0	1/100
T1B	75	8.6	1/39
8740-Rita	245	9.1	1/125

Tableau IV.1: résultats du titrage des souches avant inoculation.

Les souches sous forme d'aliquotes congelées ont été diluées avec le sérum physiologique selon les détails de la dernière colonne afin d'obtenir un inoculum de 10^7 UFC/ml.

Au second titrage, les résultats n'ont pas varié. Mais deux mois plus tard, le titre a chuté surtout pour la souche 8740-Rita ($10^{8.4}$ UFC) et la culture congelée a été reprise dans 24 ml de sérum physiologique.

IV.3.2. Validation du modèle sous-cutané.

La température moyenne du troupeau avant l'inoculation des souches calculée sur 4 mesures était de $38.4 (+/-0.4^{\circ}\text{C})$. Le seuil de 39.5°C a été retenu comme critère d'apparition de la fièvre. Dans le groupe inoculé avec 8740-Rita, la fièvre est apparue 12 jours après inoculation chez 3 sur 5 animaux (numéros 128, 130, et 125). Vingt sept jours après inoculation, la température est redescendue en dessous du seuil retenu (figure IV.1). Dans le groupe inoculé avec la souche PG1, la température est restée inférieure à 39°C durant toute la période de suivi.

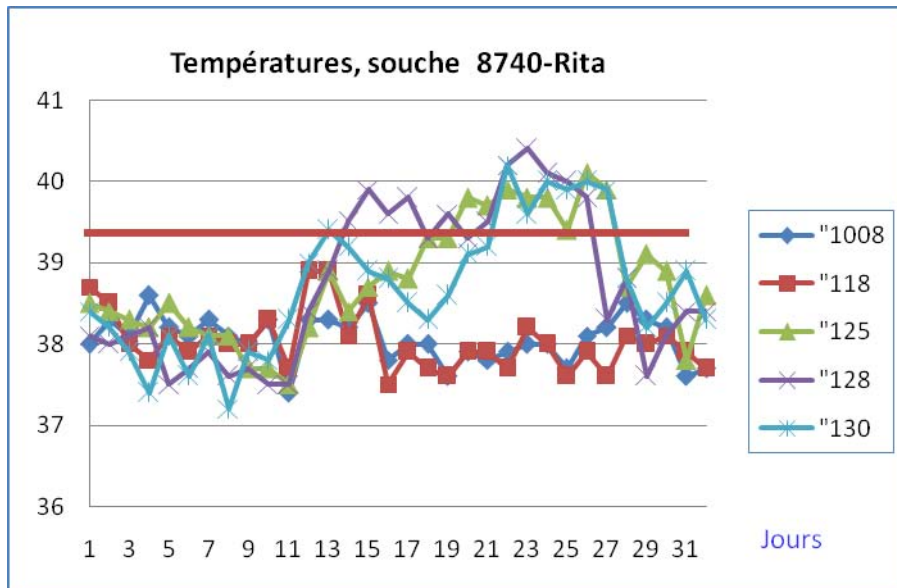


Figure IV.1 : cinétique des températures des animaux inoculés avec la souche 8740-Rita. Les températures sont prises chaque jour à partir de la date d'inoculation. La barre rouge horizontale représente le seuil de 39,5°C retenu pour marquer l'apparition de la fièvre.

Les réactions au point d'inoculation sont apparues dans le groupe inoculé avec 8740-Rita au 16^e jour (figure IV.2). Dans le groupe PG1, deux animaux (n° 131 et 333) ont eu une faible réaction qui a vite été résorbée (figure IV.3). La taille maximale mesurée a été de 25mm x 32 mm. 22 jours après inoculation, aucune réaction n'était palpable. Il n'y a pas eu de réaction ganglionnaire, les températures étaient inférieures à 39°C durant toute la période de suivi.

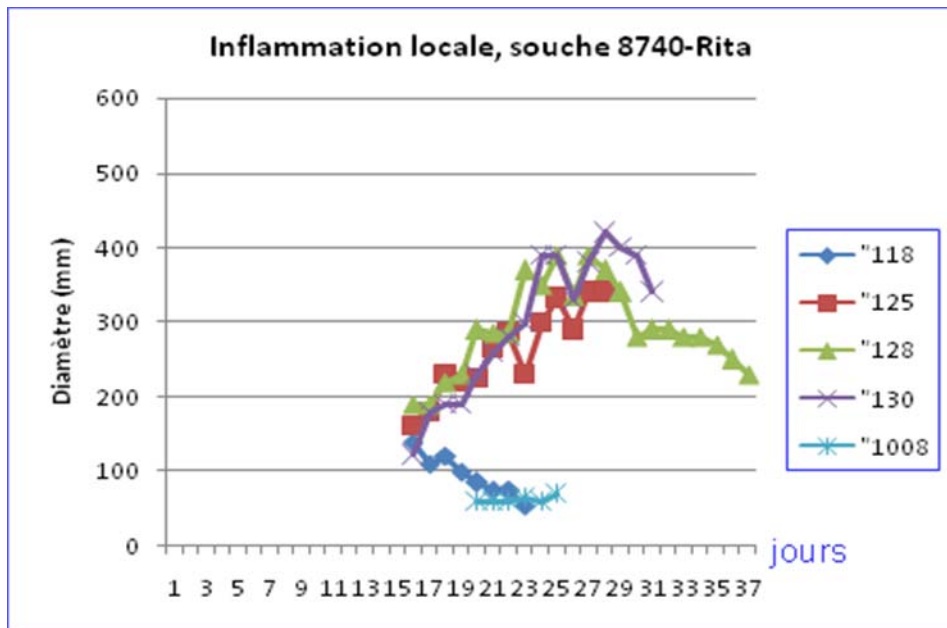


Figure IV.2 : Evolution du diamètre de la réaction locale des animaux inoculés avec la souche 8740-Rita.
Le diamètre de la réaction était mesuré horizontalement chaque jour à partir de l'inoculation (jour 1).

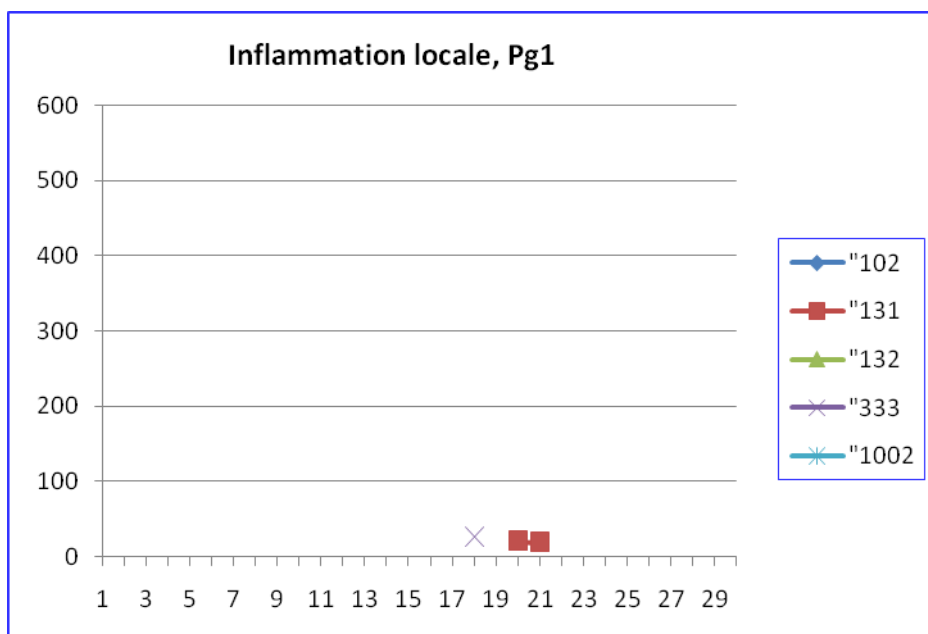


Figure IV.3 : réactions locales au point d'inoculation avec la souche PG1.
Les réactions locales au point d'inoculation sont quasi-nulles avec la souche PG1.

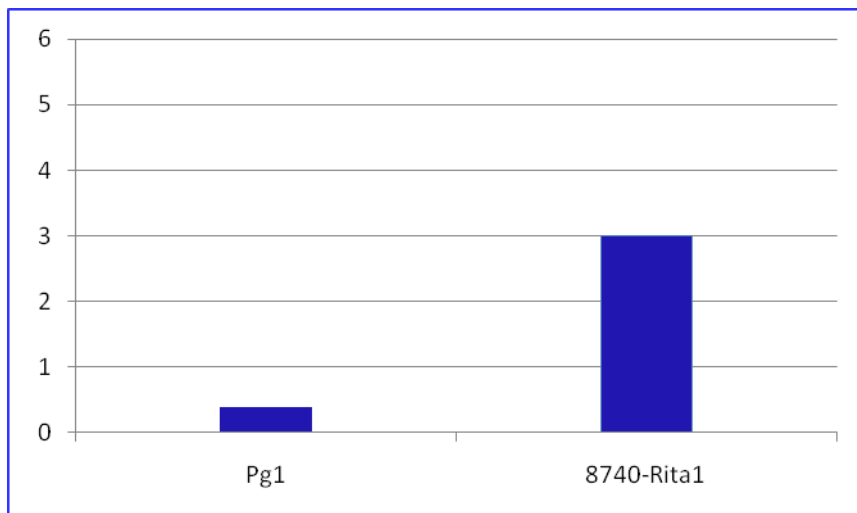


Figure IV.4 : index de pathogénicité des souches PG1 et 8740-Rita. Les index moyens ont été calculés pour chaque groupe.

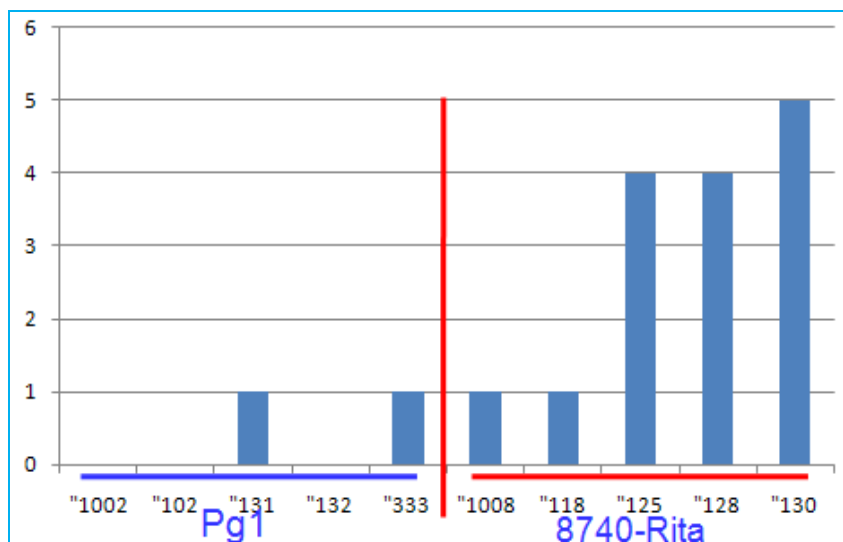


Figure IV.5 : Index individuels de pathogénicité des souches PG1 et 8740-Rita. A gauche, les animaux inoculés avec la souche PG1. A droite les animaux inoculés avec la 8740-Rita.



Figure IV.6: phénomène de Willems au point d'inoculation chez l'animal 128. A gauche l'animal N° 128, 17 jours après avoir été inoculé avec la souche 8740-Rita. A droite le même animal 35 jours après l'infection. Les oedèmes ont atteint la partie déclive de l'encolure et de la poitrine. Une nécrose est visible au point d'inoculation. Les flèches indiquent l'emplacement des liquides inflammatoires.



Figure IV.7: phénomène de Willems au point d'inoculation chez les animaux 138 et 125. A gauche, l'animal 138 montrant une nécrose au point d'inoculation trois semaines après l'infection. La plaie avait été traitée avec un antiseptique contenant du violet de Gentiane d'où la coloration violette de la lésion. A droite, l'animal 125, 32 jours après l'inoculation de la souche 8740-Rita. La nécrose est visible au point d'inoculation

Validation du modèle.

Avec la souche PG1, il n'y a pas eu de réactions inflammatoires, ni de fièvre et les index de pathogénicité sont faibles. La souche pathogène a induit des réactions inflammatoires

importantes au point d'inoculation (trois animaux sur cinq ont réagi avec des oedèmes atteignant 400 mm de diamètre). Ce modèle est validé.

Toutefois, même avec la souche dont la virulence est bien établie, seuls 3 animaux sur cinq ont réagi. Chez les deux autres animaux, les réactions ont été faibles ; L'animal 1008 n'a pratiquement pas réagi et le n° 118 avait une réaction inflammatoire dépassant à peine 100 mm. Cette absence de réaction pour ces deux animaux peut être due soit à une faible inoculum soit que ces animaux sont plus résistants que les autres. Il n'est pas exclu qu'avec un inoculum plus fort (10^8 ou 10^9 UFC), que ces animaux puissent réagir.

IV.3.3. Résultats de l'étude comparée de la virulence de certaines souches.

IV.3.3.1. Groupe inoculé avec la souche T1B.

Les réactions locales au pont d'inoculation ont été faibles, quasi-nulles, ne dépassant pas 100 mm observées sur deux animaux (103 et 110). Les températures sont restées inférieures à 39°C durant toute la période de suivi (figures IV.8, IV.9).

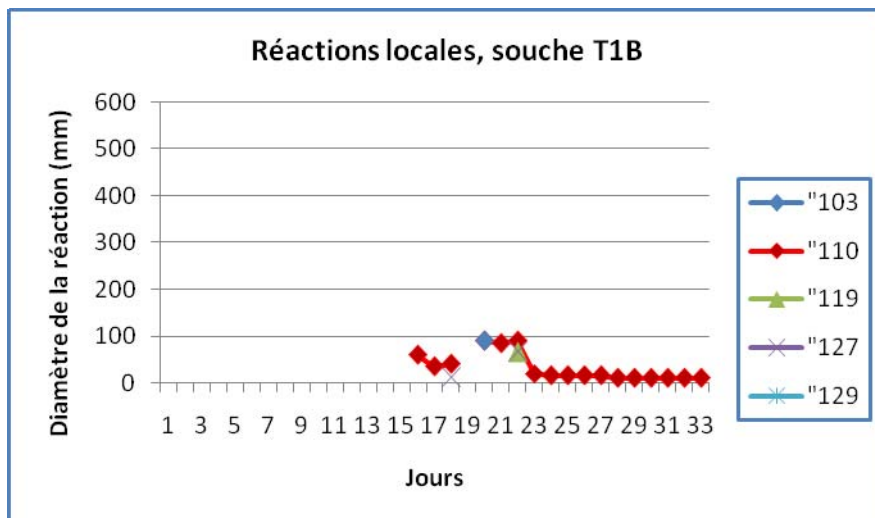


Figure IV.8. Réactions locales induites par la souche T1B.

Les réactions ont été mesurées au pied à coulisse chaque matin. Elles n'ont pas dépassé 100 mm et dès le 23 jours, elles étaient à peine perceptibles.

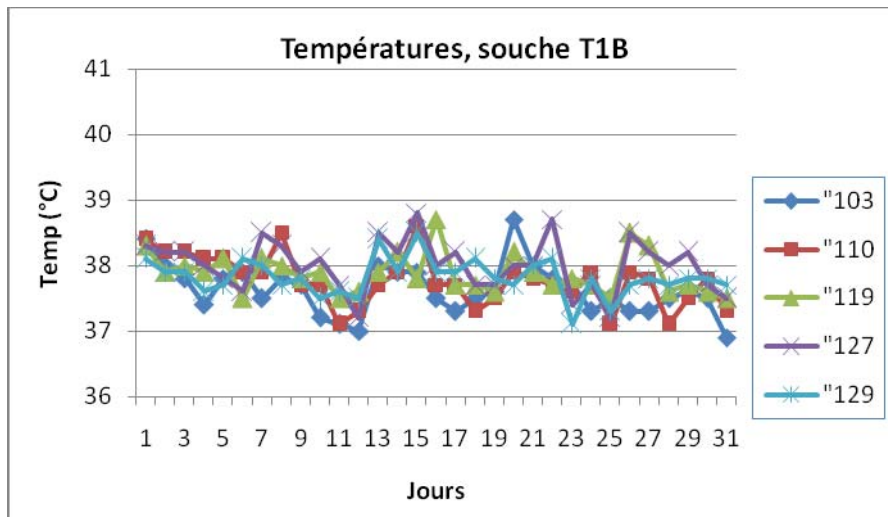


Figure IV.9 : Courbes de températures des animaux inoculés avec la souche T1B. Les températures ont été prises chaque matin pendant un mois. Les températures sont restées inférieures à 39°C durant toute la période de suivi.

IV.3.3.2. Groupe inoculé avec la souche T1BBC2.

Les températures sont restées inférieures à 39°C et les réactions au point d'inoculation étaient quasi-nulles (figures IV.10, IV.11). Les premières réactions inflammatoires ont été notées à 17 jours après inoculation chez trois animaux (106, 141, 142). La taille maximale a atteint 80 mm de diamètre.

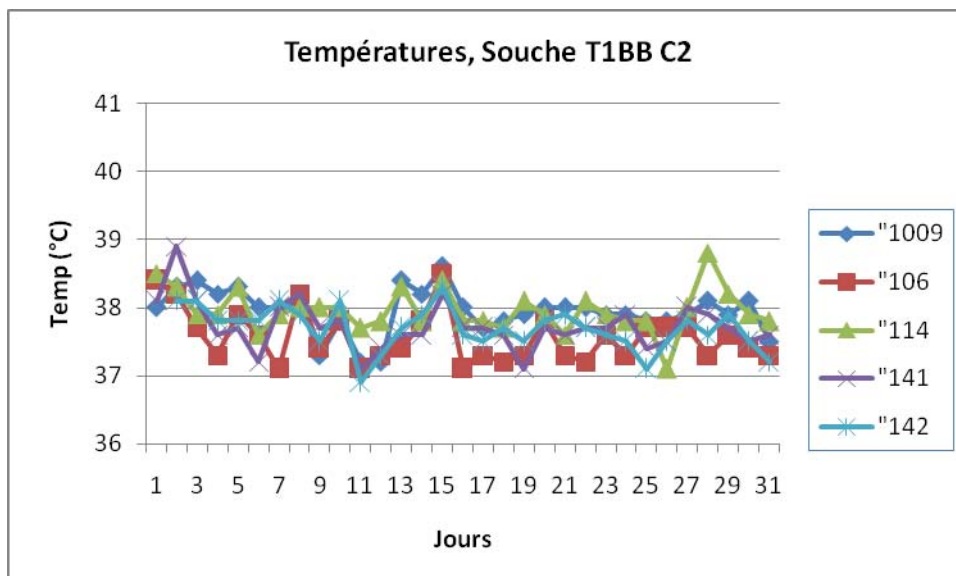


Figure IV.10 : Evolution des températures des animaux du groupe T1BBC2. Les températures ont été prises chaque matin pendant un mois. Les températures sont restées inférieures à 39°C durant toute la période de suivi.

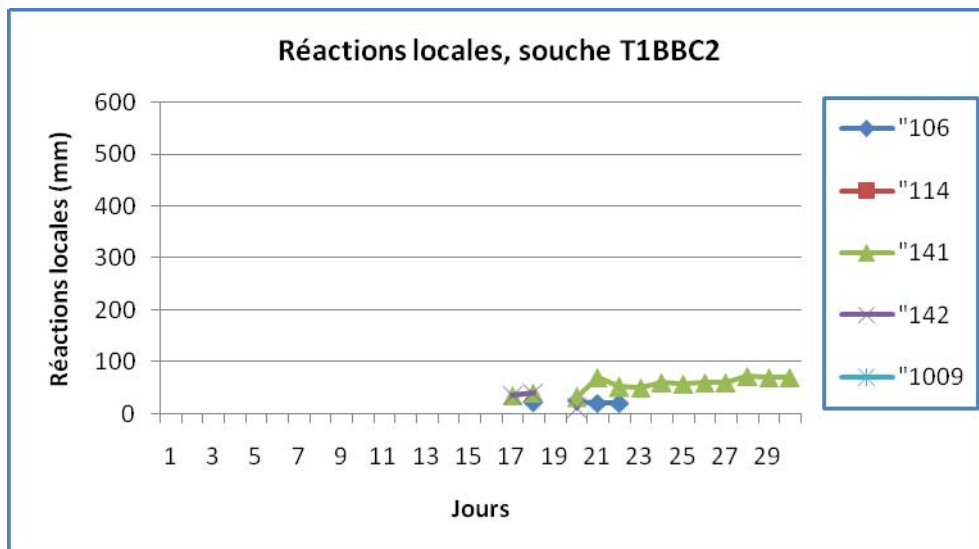


Figure IV.11 : réactions locales induites par la souche T1BBC2. Les réactions ont été mesurées au pied à coulisse chaque matin. Avec cette souche, les réactions ont été faibles, ne dépassant guère 80 mm.

IV.3.3.3. Groupe inoculé avec la souche T1BBC3.

Dans le groupe inoculé avec la souche T1BBC3, un animal a fait une hyperthermie à partir du 20^e jour après l'inoculation et la température est restée élevée pendant 8 jours (figure IV.12). Le même animal a développé le phénomène de Willems dont le diamètre maximal a atteint la de 340 mm (figures IV.13 et photo de la figure IV.14). Ces oedèmes ont atteint la partie déclive de l'encolure. Une nécrose au point d'inoculation a laissé une plaie ouverte. Les autres animaux avaient de légères réactions (347, 1003) ou pas du tout.

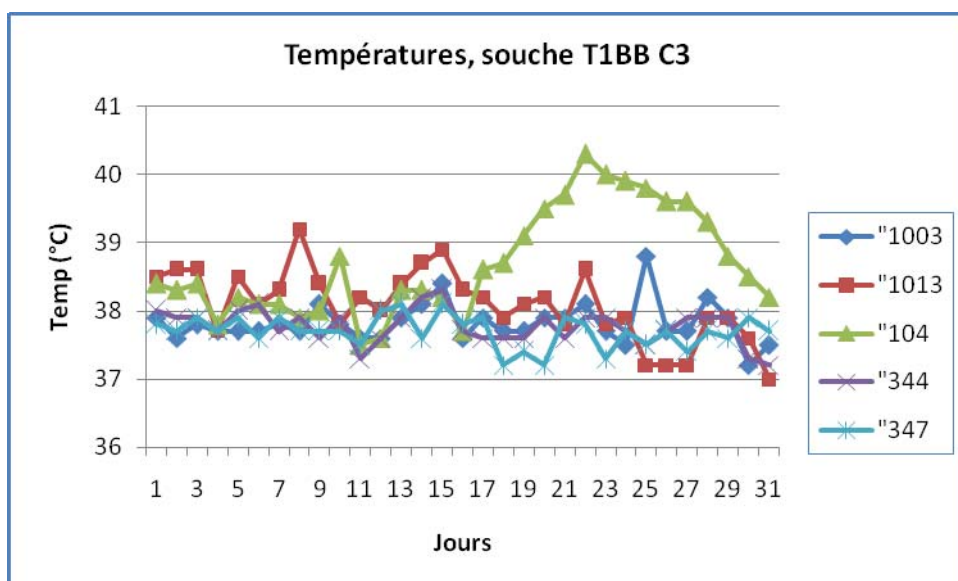


Figure IV.12: Courbes de températures des animaux inoculés avec la souche T1BBC3. Les températures ont été prises chaque matin pendant un mois. Un animal a présenté une hyperthermie à partir du 20^e jour après inoculation.

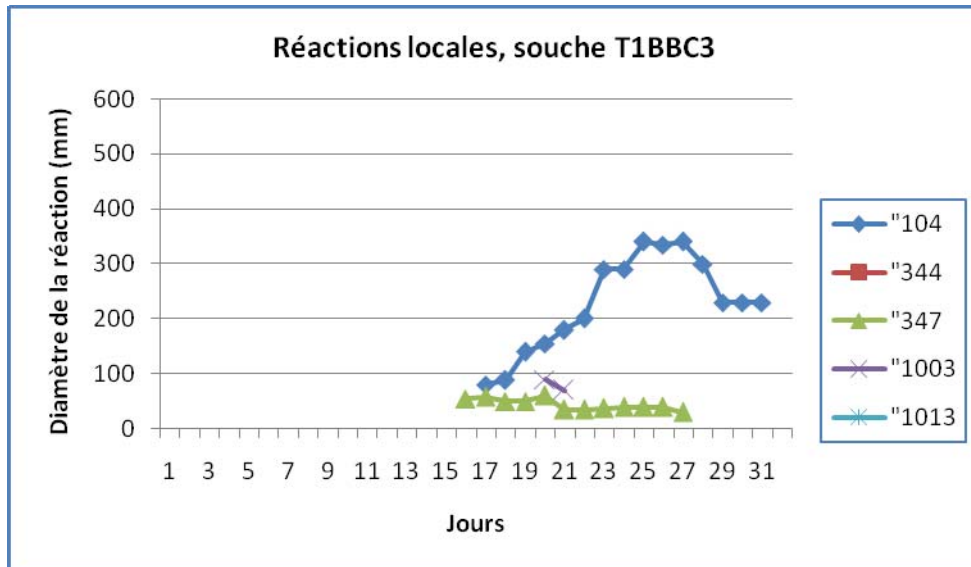


Figure IV.13 : Evolution des températures des animaux inoculés avec la souche T1BBC3. L'animal 104 a fait des réactions importantes. Avec les 4 autres sujets du groupe, les réactions ont été peu importantes.



Figure IV.14 : phénomène de Willems chez l'animal 104, 24 jours après inoculation de la souche T1BB-C3. La réaction inflammatoire couvre la quasi-totalité de la base de l'encolure (double flèche).

IV.3.3.4. Groupe inoculé avec la souche T1-44.

La taille maximale de la réaction mesurée a été de 180 mm 16 jours après l'inoculation (Figure IV.15). Ensuite, l'inflammation a commencé à se résorber et à J22, aucune réaction n'était visible. Avec cette souche, la réaction inflammatoire était dure à la palpation, non œdémateuse. Les essais d'aspiration d'un éventuel exsudat se sont soldés par un échec. Les ganglions régionaux ont modérément réagi. 4 animaux sur 5 ont réagi de cette manière.

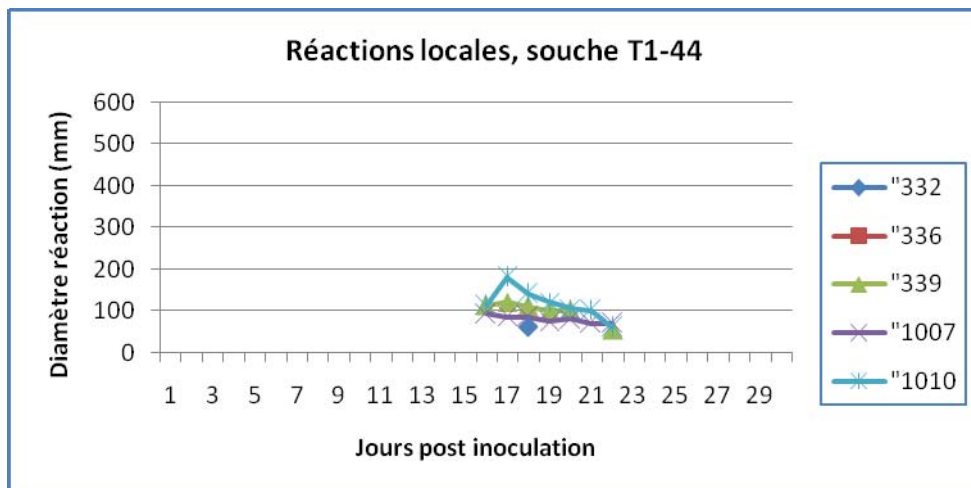


Figure IV.15 : réactions locales induites avec la souche vaccinale T1-44.

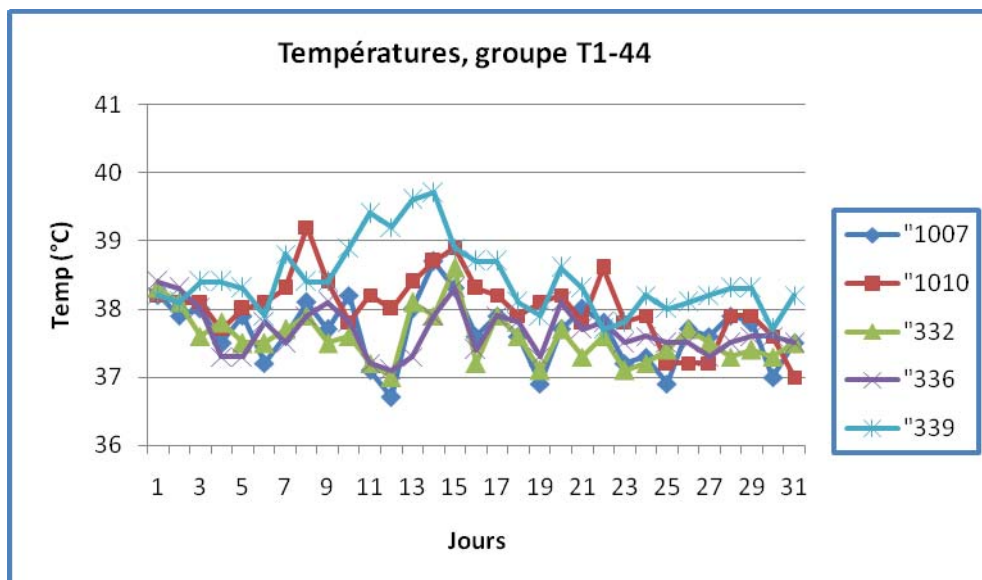


Figure IV.16 : Courbes de températures des animaux inoculés avec la souche vaccinale T1-44. Seul un animal (339) a une température atteignant le seuil de 39,5°C.

Résultats sérologiques.

Dans le groupe inoculé avec la souche 8740-Rita, les anticorps en LppQ –ELISA sont apparus à la 3^è semaine et sont restés à un niveau élevé. Ils ont commencé à descendre deux mois après l’inoculation. Toutefois, un animal (n° 1008) n’a pas présenté de séroconversion et un autre a présenté une séroconversion de courte durée. En C-ELISA, seul un animal (n° 1008) a fait une réaction de courte durée. Avec les autres animaux, le PI est resté inférieur au seuil de positivité.

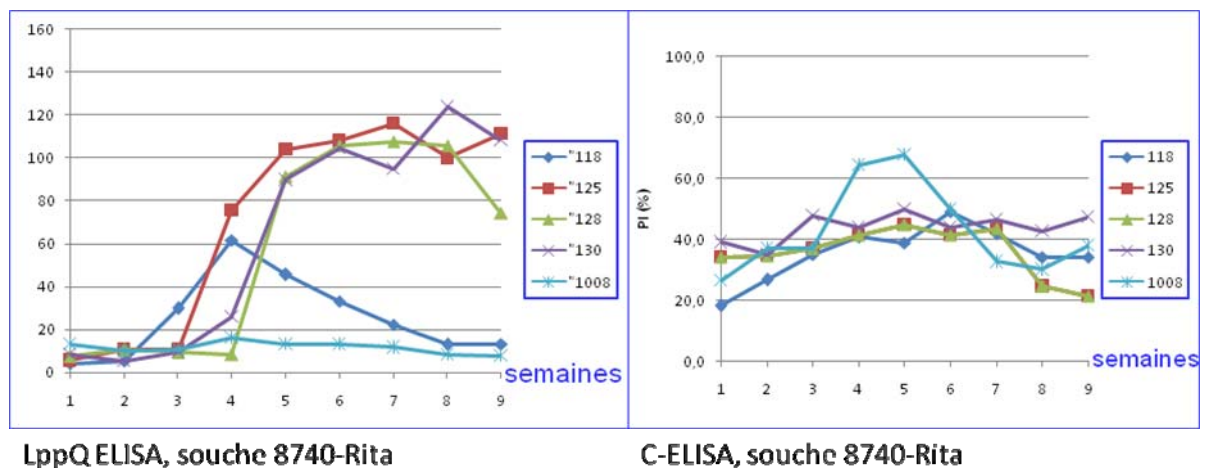


Figure IV.17: cinétique des anticorps en C-ELISA et LppQ –ELISA chez les animaux inoculés avec la souche 8740-Rita. Le seuil de positivité retenu est de 35 % pour le LppQ-ELISA et 50 % pour le C-ELISA.

Pour l’ensemble des résultats sérologiques, nous avons observé une corrélation entre les résultats cliniques (fièvre et phénomène de Willems) et les résultats de sérologie en LppQ-ELISA mais pas avec les résultats de C-ELISA. Les valeurs contrôles utilisées en C-ELISA (densité optique de l’anticorps monoclonal et des sérums de contrôle) étaient à la limite des valeurs habituellement retenues. Ces valeurs étant faibles, les résultats n’ont pu être validés.

IV.3.4. Etude du pouvoir immunogène de certaines souches de MmmSC.

Dans le groupe contrôle (animaux naïfs inoculés avec 8740-Rita), les réactions inflammatoires ont débuté cinq jours après l’infection (figure IV.18). Deux semaines après l’épreuve, tous les 5 animaux ont réagi avec des œdèmes étendus couvrant toute l’épaule, l’encolure et la partie déclive de la poitrine. L’animal 1008, inoculé lors du premier essai avec

la souche 8740-Rita et qui n'avait pas réagi, a présenté cette fois-ci des lésions semblables à celle du groupe contrôle positif (figure IV.19). L'animal numéro 116 utilisé comme contrôle est mort 24 jours après l'épreuve avec des larges œdèmes.

L'animal numéro 128 inoculé initialement avec la souche pathogène 8740-Rita est mort trois semaines plus tard par accident (chute dans la mangeoire). Les traitements antibiotique et anti-inflammatoire (PhenylarthriteND) n'ont pas permis de sauver ces deux animaux. Le veau né de la femelle 349 a été abattu et autopsié à la fin de l'expérimentation à l'âge de 48 jours. Les autres animaux (inoculés avec les souches T1-44, T1B, T1BBC2, T1BBC3 et PG1, et éprouvés avec 8740-Rita) n'ont présenté aucun symptôme visible.

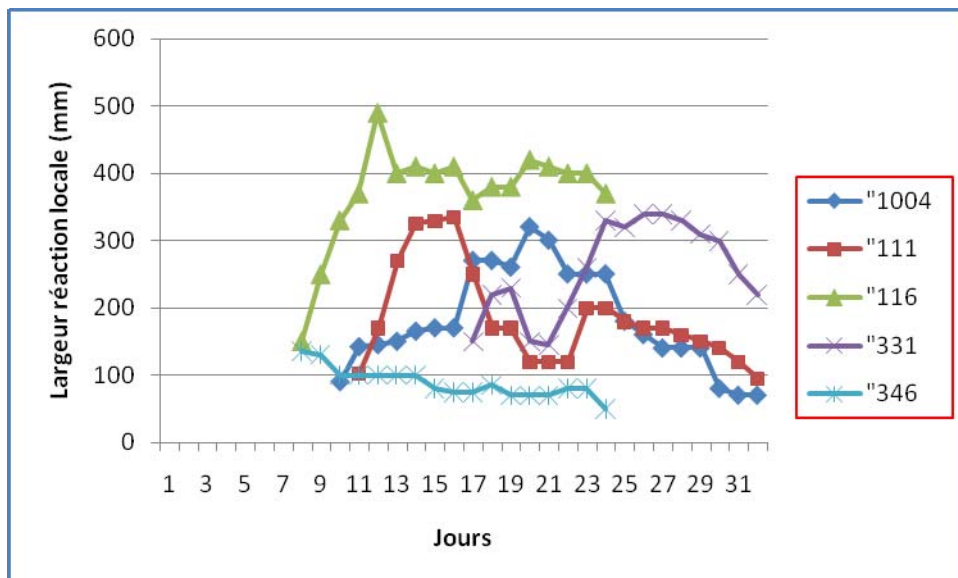


Figure IV.18 : Réactions locales des animaux contrôles inoculés avec la souche 8740-Rita. En abscisse, les jours qui ont suivi l'inoculation de la souche.

Les index de pathogénicité des groupes inoculés avec 8740-Rita sont présentés dans les tableaux IV.2 et IV.3 ci-dessous et représentés par les histogrammes des figures IV.4, IV.5 et IV.20. Rita 1 et Rita 2 représentant respectivement la première et la seconde inoculation.

N° boucles	Fièvre	Réactions de Willems	Score final
118	0	1	1
125	2	2	4
128	2	2	4
130	2	3	5
1008	0	1	1
Rita 1	1,2	1,8	3

Tableau IV.2: Index de pathogénicité lors de la première inoculation de la souche 8740-Rita.

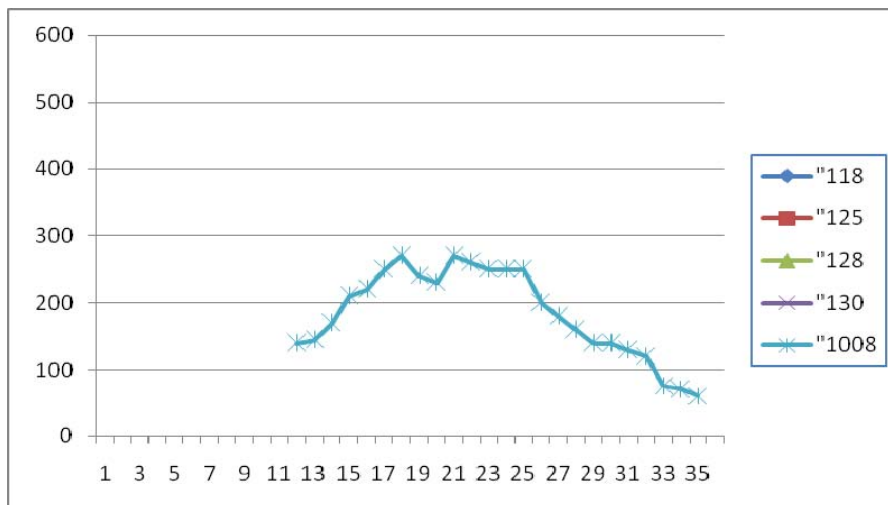


Figure IV.19 : Evolution du diamètre de la réaction locale des animaux inoculés avec la souche 8740-Rita et éprouvés avec la même souche 2 mois plus tard. Seul un animal (1008) sur 5 a réagi. En abscisses, les jours de suivi et en ordonnées, la largeur des œdèmes en millimètres.

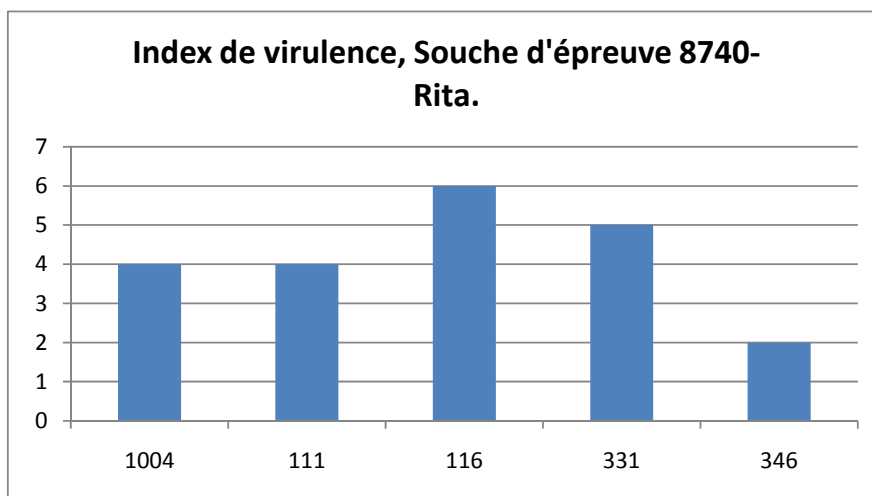


Figure IV.20 : Index de virulence lors de la 2^e inoculation de la souche pathogène 8740-Rita. En abscisses, les numéros d'animaux, en ordonnées, les index de virulence. La moyenne des index pour le groupe a été de 4,2.

N° boucles	Fièvre	Réactions de Willems	Score final
111	2	2	4
116	3	2	5
331	3	3	6
346	1	1	2
1004	2	2	4
Rita 2	2,2	2	4,2

Tableau IV.3 : Index de pathogénicité lors de la deuxième inoculation (contrôles positifs) de la souche 8740-Rita.

Traitement antibiotique.

Lorsque les réactions inflammatoires étaient importantes et que la vie des animaux semblait menacée (fièvre de plus de 40°C pendant 2 jours, inappétence, etc.), un traitement à l'oxytétracycline 20 % était appliqué. Les animaux 1008, 1004, 331 et 116 ont ainsi été traités.

Lésions

Tous les animaux ont été sacrifiés et autopsiés. L'animal 128 mort après une chute dans la mangeoire avait des poumons congestionnés certainement dus à la position en décubitus latéral toute la nuit. Le numéro 116 avait des œdèmes couvrant toute la région scapulaire, la poitrine et toute la partie déclive de l'animal. Les œdèmes ont même atteint le côté droit de l'animal. Les deux ganglions pré-scapulaires ont augmenté de volume et sont œdémateux à l'incision. Les lobes crâniens des poumons étaient congestionnés et les lobes postérieurs avaient de l'emphysème. L'animal 141 avait une légère inflammation d'un feuillet de la plèvre (surface des poumons), le parenchyme pulmonaire semblait normal. Le veau né de la femelle 349 a présenté des lésions caractéristiques de la PPCB aigue.

Bactériologie

Les liquides de ponction au point d'inoculation ont fait l'objet de recherche de mycoplasmes. Les mycoplasmes ont été isolés du liquide de ponction des animaux suivants : 128, 104, 1001, 130, 125, 116, 1008 et 346. L'identification de MmmSC a été confirmée par PCR avec les

amorces MSC1/MS2 (Dedieu et al, 1994). L'animal 111 (contrôle positif) a eu une réaction de Willems mais aucun mycoplasme n'a pu être isolé. MmmSC a également été isolé des poumons du veau né de la vache 349 et abattu à l'âge de 48 jours avec des lésions de PPCB.

Immunité induite par les souches de MmmSC.

Les animaux naïfs utilisés comme contrôles ont présenté des réactions de Willems et de la fièvre qui ont même entraîné une mortalité (animal 116). Quatre animaux sur cinq ont réagi (figure IV.18). A l'exception d'un seul animal (1008), tous les autres animaux éprouvés en même temps avec la même souche n'ont pas réagi : pas de fièvre, pas de phénomène de Willems et pas de séroconversion. Ce qui indique l'acquisition d'une immunité induite par des souches inoculées deux mois plus tôt. Cette immunité a été induite par l'inoculation de ces souches y compris la souche PG1 qui n'avait induit ni fièvre, ni séroconversion ni phénomène de Willems. L'animal 1008 n'avait pas fait de séroconversion ni de réactions willemsiennes à la suite de la première inoculation avec la même souche. Mais il a réagi fortement lors de l'épreuve avec des œdèmes de plus de 250 mm de diamètre (figure III.15).

IV.4. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Au cours de ces essais, nous avons validé le modèle d'inoculation sous-cutané pour l'étude de la virulence. La souche pathogène 8740-Rita a induit, au cours de ces deux essais, des réactions inflammatoires importantes, de la fièvre et des index de virulence élevés. La pathogénicité de cette souche, établie lors de nos précédentes manipulations (Yaya et al., 1999) a bien été mise en évidence par le modèle sous-cutané. Cette étude a également confirmé le caractère apathogène de la souche de référence. La souche PG1 n'a en effet induit aucune réaction au point d'inoculation, avec l'inoculum de 10^7 UFC, et n'a pas entraîné la moindre séroconversion chez les cinq animaux inoculés. Les index de virulence sont restés faibles. Une réaction inflammatoire ne dépassant pas 3 cm observé chez deux animaux (131, 333) semble due au traumatisme provoquée par l'aiguille et non par MmmSC. Ce qui nous permet de valider le modèle expérimental proposé (en annexe). Ce modèle constituera une alternative à la méthode endo-bronchique d'inoculation des souches avec transmission de MmmSC aux animaux en contact (Hudson et Turner, 1963) qui certes reproduit la PPCB sur le plan clinique et lésionnel mais qui a de nombreux inconvénients. En effet, cette méthode est difficilement reproductible. Le taux de réussite de l'infection chez les intubés et chez les animaux en contact est très variable même avec la même souche. Cette méthode induit en plus

une souffrance animale importante conduisant parfois à la mort avec des troubles respiratoires importantes. Avec le modèle sous-cutané, les animaux peuvent être traités avec antibiotiques et des anti-inflammatoires à partir du 20^e jour afin d'éviter des réactions œdémateuses importantes et de la nécrose au point d'inoculation. La nécrose, les œdèmes étendus atteignant les parties déclives et la mortalité ne sont pas nécessaires à la comparaison des souches, la mesure de la réaction locale et la prise de températures suffisent. La récupération des animaux en fin d'expérimentation pour la boucherie permet de diminuer le coût de l'expérimentation.

Nous avons utilisé un inoculum de 10^7 UFC pour valider ce modèle. Toutefois, même avec une souche aussi pathogène, tous les 5 animaux du groupe n'ont pas présenté de réactions de Willems. Cette absence de réaction peut être due soit à la présence d'animaux résistants dans le groupe malgré la répartition aléatoire des bovins, soit à la faiblesse de l'inoculum. On sait en effet que dans un effectif, dans les conditions naturelles ou expérimentales, environ 25 % des animaux sont résistants à la PPCB (Provost et al., 1987). En augmentant le nombre d'animaux par lot, on limitera la variabilité que la présence de tels animaux induit sur les résultats. Nous proposons de porter le nombre d'animaux par groupe à 10 et l'inoculum à 10^8 UFC.

L'application de ce modèle ne nécessite pas une technicité particulière. Des techniciens de qualification moyenne pourraient effectuer les mesures de la réaction inflammatoire en même temps que les prises de températures.

Le modèle étant validé, nous l'avons utilisé pour comparer le pouvoir pathogène de certaines souches. L'objectif était de rechercher si certaines d'entre elles ont reverté à la virulence ou non. Nous avons comparé le pouvoir pathogène de six souches de MmmSC : la souche vaccinale T1-44, ses dérivés T1B, T1BBC2, T1BBC3, la souche de référence PG1 et la souche 8740-Rita. Le groupe d'animaux inoculé avec la souche vaccinale T1-44 a induit des réactions inhabituelles : réactions dures, non œdémateuses au point d'inoculation sur trois des cinq animaux et des index de virulence importants. Dès lors, nous ne pouvions pas comparer les réactions induites par les différentes souches, la souche T1-44 étant un des contrôles. Nous ne pouvons donc pas conclure sur la réversion éventuelle de la souche vaccinale T1-44 à la virulence. Notons aussi que cette souche diffère de celle qui a été utilisée au Kenya et qui a été à l'origine d'importantes réactions de Willem (Wesonga et al., 2000 ; Wesonga et al., 2003). La souche utilisée dans cette étude provient du laboratoire de production des vaccins du LANAVET (Garoua, Cameroun).

Le cas de l'animal 1008 mérite d'être souligné. Après la première inoculation, il n'a manifesté aucun signe clinique. Mais après la seconde inoculation deux mois plus tard avec la même souche 8740-Rita, les réactions de Willems et la fièvre apparurent. L'hypothèse d'une mauvaise injection de la culture ne doit pas être écartée. Il n'est pas exclu que les mouvements brusques et agités des animaux dans le couloir de contention puissent provoquer le refoulement de l'inoculum. D'où la nécessité d'assurer une bonne contention des animaux et éviter de les relâcher immédiatement après le retrait de l'aiguille.

Au cours de ces expérimentations, un veau né d'une mère infectée et abattu à l'âge de 48 jours a présenté, à l'autopsie, des lésions de poumons caractéristiques de PPCB, lésions à partir desquelles, MmmSC a été isolé. Généralement, il est admis que les jeunes de moins de six mois sont moins réceptifs à la maladie et qu'en cas d'infection, ils développent beaucoup plus la forme articulaire et non la forme pulmonaire de la PPCB (Provost et al. 1987). Les raisons de la faible réceptivité des jeunes ne sont pas bien connues. Le pouvoir pathogène de cette souche vélogène et une pression d'infection forte pourraient expliquer l'apparition des lésions pulmonaires chez les jeunes qui habituellement n'en présentaient pas beaucoup.

Cette étude a montré que les souches inoculées ont induit une immunité chez les animaux. Même la souche PG1 qui n'a montré aucune virulence (absence de fièvre, absence de phénomène de Willems) et n'a pas induit de séroconversion semble immunogène. Notons que pour cette étude, les animaux ont été éprouvés deux mois après l'inoculation. Il est fort probable que ce temps soit court pour pouvoir déceler une véritable immunité. En effet pour les souches vaccinales les plus utilisées actuellement contre la PPCB (T1-44 et T1-SR), ce qui les différencie, c'est surtout la durée de l'immunité, qui est plus longue avec la souche T1-44 (Thiaucourt et al., 2004). Le taux de protection à trois mois est similaire pour les deux souches. Pour notre expérimentation, si l'épreuve avait eu lieu plusieurs mois après la première inoculation, les résultats pourraient peut-être être différents. L'épreuve a été effectuée par la voie sous-cutanée qui n'est pas la voie naturelle d'infection des animaux en cas de PPCB. Dès lors, cet état immunitaire observé pourrait ne pas protéger les animaux si ceux-ci s'infectaient par la voie endo-bronchique. Dans la PPCB, l'immunité est surtout à médiation cellulaire. L'absence de séroconversion, suite à la deuxième inoculation d'épreuve, ne peut donc pas être considérée comme une absence d'immunité. Au contraire, cela montre que les animaux ont réussi à éliminer les mycoplasmes très précocement qui n'ont pu se

multiplier suffisamment et induire une réaction inflammatoire qui aurait débouché sur une séro-conversion.

En conclusions, cette expérimentation nous a permis de :

- De confirmer que la souche PG1 (stock SVA) est dénuée de tout pouvoir pathogène lorsqu'elle est utilisée par la voie sous-cutanée avec un inoculum de 10^7 UFC.
- De confirmer que la souche 8740-Rita garde tout son pouvoir pathogène ;
- valider un modèle sous-cutané en vue d'étude de la virulence des souches de MmmSC et de proposer un protocole standard (présenté en annexe). Ce modèle sera utile pour les recherches sur les gènes de virulence en validant sur le plan clinique, les observations qui seraient effectuées en génomique comparative.

CONCLUSIONS GENERALES

La péripneumonie contagieuse bovine, mycoplasmosse majeure des bovins, est toujours enzootique dans de nombreux pays, notamment en Afrique intertropicale. Malgré la rareté d'informations validées, les enquêtes auprès des services vétérinaires laissent penser que les pertes économiques qu'elle occasionne sont importantes. Dans d'autres continents, comme l'Asie, elle est suspectée mais il conviendrait de vérifier le statut exact de certains pays. En Europe elle réapparaît de façon sporadique tous les dix à vingt ans sans qu'on sache exactement l'origine des foyers.

La lutte contre la PPCB dans les pays développés repose sur l'utilisation de plusieurs outils :

- La détection des foyers. Cela a pu se faire dans le passé simplement par l'observation des signes cliniques et des lésions. Cette détection est maintenant facilitée par l'utilisation de tests sérologiques (fixation du complément, ELISA) ou bien par la détection directe de l'agent causal (PCR, Q-PCR).
- L'abattage des animaux atteints ou mieux l'élimination des troupeaux infectés.
- La vaccination. Celle-ci a notamment été utilisée en Australie afin de faire baisser la prévalence avant l'application à moindre coût, des stratégies strictement sanitaires.
- Le contrôle des mouvements des animaux. Celui-ci est indispensable pour éviter la multiplication des foyers à partir des animaux infectés qui ne peuvent pas être détectés. Il convient à ce propos de souligner l'importance des porteurs chroniques chez lesquels, il n'existe plus d'anticorps détectables même avec des tests sérologiques sensibles.

La persistance de la péripneumonie contagieuse bovine en Afrique s'explique aisément. En effet la plupart des Etats n'ont ni les moyens financiers ni même les moyens politiques de faire appliquer des mesures de lutte contraignantes. Dans la plupart des cas, la seule mesure qui est appliquée est la vaccination. Encore, elle n'est appliquée que sur une fraction du cheptel selon des stratégies qui ne sont pas clairement définies et sans aucune cohérence. Dans la mesure où, même une couverture vaccinale de 100% ne permet pas, à elle seule, d'aboutir à une éradication, on comprend aisément les limites des mesures de lutte mises en œuvre contre cette maladie.

Cette thèse avait pour but d'améliorer certains outils qui peuvent être utiles à une meilleure connaissance de la PPCB et à l'amélioration des moyens de lutte. Deux objectifs principaux ont été visés : l'amélioration des systèmes de typage moléculaire des souches de MmmSC et l'établissement d'un modèle expérimental pour mesurer le pouvoir pathogène des souches.

Le premier système de typage MLSA développé en 2003 a apporté plus de précisions que toutes les autres méthodes utilisées auparavant sur les souches de MmmSC en identifiant jusqu'à 15 groupes de souches. Il a confirmé les différences observées entre les souches d'origine européennes et les souches africaines ou australiennes. Parmi les souches africaines, des différences ont été observées entre les souches d'Afrique australe, d'Afrique de l'Ouest et celles du reste du continent (Lorenzon et al., 2003). Mais ce système nécessitait une amélioration. Certaines amorces qui avaient été sélectionnées (avant la publication de la séquence complète de PG1) avaient des sites d'hybridation multiples ou étaient présentes dans des zones dupliquées. Le nouveau système MLSA que nous proposons est beaucoup plus robuste. Avec huit locus sélectionnés aussi bien dans des gènes de ménage que sur des séquences non codantes, il permet de distinguer 9 groupes et 31 profils alléliques dans un échantillon de 48 souches représentatives des régions où la PPCB a sévi ou continue de sévir. Il a confirmé les résultats du premier système MLSA en y apportant plus de précision dans la distinction des souches. Ainsi, les souches européennes qui appartiennent toutes au groupe C, se répartissent en trois profils alléliques différents. Le groupe B comprend des souches trouvées en Afrique australe, en Afrique de l'Est, en Inde et en Australie. Le groupe A, le plus vaste se retrouve en Afrique de l'Ouest et du Centre. La présence des groupes alléliques dans une même région est en concordance avec l'épidémiologie de la maladie dans la région : en Afrique de l'Ouest par exemple, la présence du profil A12 au Mali, au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire semble liée aux mouvements de transhumance dans la zone. De même, dans le pouvoir du lac Tchad où transhument les animaux du Niger, du Nigeria, du Cameroun et du Tchad, 4 profils alléliques ont été identifiés (A00, A02, A03 et A04).

Le système MLVA avec trois locus a également apporté une bonne distinction entre les souches. Le locus VNTR TR34 seul a permis de distinguer 12 allèles différents. En incluant ce marqueur aux 8 locus de MLSA, la précision du système est nettement améliorée. Le nombre de profils est passé de 31 à 36. Parmi les souches européennes, le profil C01 s'est scindé en deux sous-groupes : Italie-France et Portugal. Dans le groupe A04 qui regroupait les souches du Cameroun, du Niger et du Bénin, l'adjonction du locus TR34 définissait un sous-

groupe par pays. Dans le profil B03, le locus TR34 permet de distinguer les souches du Soudan et de Tanzanie (un sous-groupe) des souches australiennes ou indiennes (un autre sous-groupe). La technique MLVA a un avantage particulier qu'elle peut être mise en œuvre dans des laboratoires à faibles moyens mais capables d'effectuer une PCR et une électrophorèse sur gel d'agarose.

Ce nouveau système de typage par MLSA peut ouvrir de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension de la plasticité des génomes. A ce effet, il serait intéressant d'obtenir de l'ADN ancestral à partir des prélèvements d'animaux infectés conservés dans du formol pour histologie. Ce qui permettrait une caractérisation des anciens profils alléliques ayant circulé en Europe, en Afrique et dans les autres continents et qui permettrait une meilleure compréhension de l'évolution des souches. Ce système MLSA peut être appliqué pour une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la PPCB, la surveillance et le contrôle de la maladie. De nouveaux locus pourront être ajoutés pour augmenter la discrimination du système sur des souches très proches les unes des autres. Y seront inclus, des souches isolées des caprins dans diverses régions du monde afin de voir si leurs profils diffèrent de ceux des souches d'origine bovine ou au contraire sont plus proches de ceux des bovins circulant dans la même région. Les résultats obtenus dans cette étude seront inclus dans un site internet sur l'épidémiologie moléculaire dans un projet financé par l'Union européenne (EPIZONE). Cet outil pourrait faciliter la diffusion des méthodes de typage des souches pathogènes permettant à chaque laboratoire de comparer ses propres résultats à ceux d'une banque de données et obtenir des arbres de phylogénie, d'actualiser des cartes géographiques si toutefois les coordonnées géographiques des foyers sont connues. Un tel outil aura des liens avec des sites des organismes internationaux tels l'OIE (<http://www.oie.int/wahid-prod/>) et la FAO (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/disease_cbpp.asp) qui fournissent des informations à jour sur les maladies transfrontalières à déclaration obligatoire.

Au terme de notre étude, il est clair que le génome de MmmSC est particulièrement peu polymorphe, notamment en ce qui concerne le taux de mutations. Il n'a pas été possible de mettre en place un système de typage « MLST » étant donné la conservation des gènes de ménage dans ce biotype. Cette conservation ne se retrouve pas chez le plus proche « cousin » de MmmSC à savoir le biotype MmmLC (Manso-Silvan et al., 2008). Ce qui laisserait penser que l'adaptation des souches de MmmSC aux bovins a été un phénomène récent en termes

d'évolution. La conservation des gènes de ménage nous a amené à chercher des zones plus polymorphes dont la conservation n'est pas indispensable à la survie de la bactérie, à savoir des zones non codantes ou bien au contraire des gènes qui codent pour des antigènes de surface et qui, de ce fait, pourraient être plus variables car soumis à une pression de sélection. A ce titre, il serait intéressant d'étudier des souches dont l'historique est bien connu et qui ont été isolées à plusieurs dizaines d'années d'intervalle, afin de déterminer le taux de mutation sur les différents types de gènes et ainsi pouvoir déterminer leur « horloge moléculaire ».

Nous avons ensuite appliqué le système de typage dénommé « MLVA » qui est basé sur la détection des VNTR. Ce type de marqueur est particulièrement polymorphe et est couramment utilisé pour le typage des souches bactériennes, de mycobactéries par exemple. La difficulté qui avait été rencontrée par les concepteurs de ce système chez MmmSC (Janis et al., 2006 ; McAuliffe et al., 2008) avait principalement trait à la recherche d'amorces permettant l'amplification des sites VNTR. Ceci s'explique par la très grande richesse en AT du génome de MmmSC, mais également par le fait que les auteurs souhaitaient amplifier des fragments d'ADN relativement courts qui pouvaient être observés sur des gels d'acrylamide. L'étude de ces marqueurs sur notre échantillonnage de souches nous a permis de constater que tous n'étaient pas extrêmement polymorphes et que celui qui était le plus intéressant était le « TR34 ». Il serait théoriquement possible d'étudier d'autres sites VNTR en utilisant des amorces amplifiant des fragments plus longs et en séquençant ces fragments (au lieu d'évaluer leur taille par électrophorèse). Cependant, il est peu probable que de nombreux sites VNTR soient variables car nous aurions dû les détecter lors de la comparaison des génomes des souches PG1 et 8740-Rita qui sont pourtant relativement distantes l'une de l'autre.

Quelles pourraient être les pistes pour obtenir des systèmes de typage plus performants pour MmmSC ? La première piste, même si elle est encore onéreuse, pourrait consister à utiliser les nouvelles techniques de séquençage (454, Solexa, etc.) pour obtenir des séquences génomiques quasi-complètes. Ce type de techniques permettrait des comparaisons sur les séquences génomiques en copie unique. Il serait donc possible d'obtenir un système de type MLSA sur plusieurs centaines de milliers de bases. Il n'est pas sûr que ces nouvelles techniques puissent permettre de déterminer tous les VNTR. En effet, la taille des séquences obtenues par la technique Solexa (environ 30-36 bases) n'est pas suffisante pour évaluer le nombre de répétitions pour des séquences répétées assez longues. Par ailleurs, ces techniques, quand elles sont utilisées seules, ne permettent pas de détecter le positionnement des

séquences répétées particulièrement nombreuses chez MmmSC (notamment les séquences d'insertion). Pour ces dernières, il conviendra donc de développer d'autres techniques car le Southern Blotting ne peut pas donner de résultats parfaitement fiables, étant donné le nombre de copies des IS. En effet le nombre réel de copies peut être masqué par de nombreux facteurs : bandes ayant pratiquement la même longueur, copies partielles dont l'intensité varie, polymorphisme à l'intérieur de certaines copies d'IS introduisant des sites de coupure supplémentaires, etc.

Concernant la situation de la péripneumonie contagieuse bovine au Cameroun, nos résultats confirment que la maladie est enzootique dans les régions du Nord et de l'Extrême-Nord. Mais son ampleur n'est pas bien perçue et ce en raison d'une absence d'enquête sur sa prévalence dans diverses zones et aussi de la méconnaissance des pertes directes et indirectes qu'elle occasionne. Les mesures de lutte entreprises ces dernières années ont été limitées à la seule vaccination avec le vaccin T1-SR et la couverture vaccinale est faible. Nous l'avons estimée à 19 %. Avec une couverture vaccinale faible, en l'absence de contrôle des mouvements d'animaux et d'abattage sanitaire, la situation sanitaire ne pourra pas s'améliorer. Au contraire, les régions qui sont considérées comme indemnes comme l'Adamaoua pourraient en faire les frais. Une enquête au niveau des principaux abattoirs du pays, une enquête sérologique dans les principales régions d'élevage du Cameroun (Adamaoua, Nord, Extrême-nord, Est et Nord-Ouest) est un pré-requis pour mener les campagnes de lutte ou pour justifier les vaccinations coûteuses qui y sont menées. Dans l'Adamaoua, par exemple, les derniers foyers officiellement signalés remonteraient à 1972. Or depuis cette date, les campagnes annuelles de vaccination y sont effectuées sans que l'efficacité de celles-ci soit évaluée ou leur opportunité expliquée aux acteurs de la filière.

Le typage moléculaire doit permettre l'identification d'une source d'infection et l'évaluation des mesures de lutte. Bien qu'ayant travaillé sur une zone restreinte (le Nord-Cameroun) et avec un échantillonnage assez restreint, les résultats ont pu montrer que les mesures de lutte mises en place en 2006 lors des foyers de Lagdo contre la PPCB nécessitent d'être revues pour un meilleur contrôle de la maladie. L'atteinte du département de Mayo-Louti (Guider-Boko) par une souche partie de Lagdo le démontre à merveille. Le polymorphisme observé sur les souches de MmmSC circulant au Nord-Cameroun est tout à fait conforme à la situation d'enzootie de la maladie dans cette région. Cette situation s'explique facilement. Il n'est pas possible de restreindre les mouvements de bétail dans cette région qui est une zone de

transhumance pour les pays membres de la Commission du Bassin du lac Tchad (CBLT) dont font partie le Tchad, le Niger, le Nigeria et le Cameroun ou une zone de transit pour les troupeaux en partance pour le marché nigérian qui draine un flux important d'animaux sur pieds qui traversent le Nord-Cameroun. Face à cela, la seule mesure de lutte mise en place au Cameroun par l'Etat est la vaccination et dans certains cas, l'utilisation des antibiotiques souvent à l'initiative des éleveurs. La vaccination est basée sur l'utilisation de la souche T1-SR en raison de sa parfaite innocuité. Cependant, elle confère une protection de faible durée. Si l'on estime le taux de couverture vaccinale à 20-40% dans cette zone, il est clair que la maladie ne peut être éradiquée ni même contrôlée. Les éleveurs (parfois les vétérinaires) pratiquent, en cas de PPCB, des traitements antibiotiques. Ils ne le font pas forcément de façon consciente puisque le diagnostic précis n'est souvent pas posé avant que le traitement ne soit instauré. Cependant, certains acteurs économiques ont plus intérêt à promouvoir l'utilisation des antibiotiques que celle des vaccins. Sans pouvoir s'appuyer sur des données chiffrées incontestables (quasiment impossibles à obtenir), on peut donc raisonnablement estimer que le ratio coût/bénéfice de cette stratégie ne soit pas vraiment optimum et qu'il convient de proposer une alternative.

L'étude des zones de productions de viande bovine au Nord-Cameroun montre qu'il existe deux zones bien distinctes vis-à-vis de la péripneumonie:

- La région de l'Adamaoua qui serait indemne de PPCB ;
- Les régions du Nord et Extrême Nord où la PPCB est enzootique.

Les stratégies de lutte contre la PPCB varient en conséquence. Pour ce qui est de l'Adamaoua, il importe en priorité de confirmer son statut vis-à-vis de la PPCB. En effet, si cette zone est considérée comme indemne, il y a quand même eu des suspicions cliniques et il n'est pas sûr que tous les moyens techniques disponibles aient été utilisés pour confirmer ou infirmer ces foyers. Il conviendrait notamment de procéder à une surveillance au niveau de certains abattoirs (Ngaoundéré, Meiganga Tignère, Tibati, Ngoundal) et à une enquête sérologique dans la zone où ont été observées ces suspicions (départements de Faro-et-Déou et du Djerem). La confirmation du statut « indemne de PPCB » de l'Adamaoua serait une très bonne nouvelle car cette situation est vraiment l'exception en Afrique intertropicale. Il conviendrait bien entendu de protéger au mieux ce statut pour booster la production de viande dans la région. Aucun cas de PPCB n'ayant été confirmé dans l'Adamaoua depuis 1972, la poursuite de la vaccination contre cette maladie ne s'explique ni sur le plan scientifique, ni sur le plan

économique. Sa cessation serait une première étape de l'engagement du Cameroun sur la voie OIE pour une partie de son territoire. Les efforts de vaccinations pourraient se concentrer alors sur les zones voisines afin de diminuer les pertes dans les zones touchées et par la même occasion diminuer le risque de réintroduction dans la zone indemne.

Pour ce qui est des régions du Nord et de l'Extrême-Nord, aucune stratégie de lutte ne pourra être appliquée et être efficace si elle n'est pas mise en œuvre niveau régional (Tchad, Nigeria, Niger et Cameroun). Il est notamment illusoire de vouloir contrôler les mouvements des animaux dans cette région où les frontières ont une grande porosité. Par ailleurs, on peut aussi douter de l'efficacité des campagnes de vaccination partielles pratiquées avec la souche T1-SR qui ne confère qu'une protection de l'ordre de 6 mois. Enfin, il est illusoire de vouloir appliquer une politique d'abattage dans cette zone, au risque de voir les éleveurs se révolter. L'Etat n'a d'ailleurs pas les moyens d'appliquer des mesures d'abattage systématique des animaux infectés ou contaminés, faute de pouvoir indemniser les éleveurs. C'est dans cette situation que de nouveaux vaccins seraient vraiment utiles. Ces nouveaux vaccins devraient avoir au moins deux caractéristiques nouvelles par rapport aux anciens : la capacité d'induire une protection de plus longue durée et la capacité d'induire une réponse anticorps permettant de détecter les animaux correctement vaccinés. Ce qui permettrait d'une part de bénéficier d'un effet « cumulatif » des campagnes de vaccination (le taux de protection augmentant au fur et à mesure des vaccinations annuelles réalisées) et ainsi aboutir à des taux de protection réellement efficaces pouvant empêcher le maintien de la PPCB et d'autre part, d'assurer un suivi des campagnes de vaccination nationales et un contrôle du statut des animaux transhumant à travers le pays. Enfin la bonne application de cette stratégie de lutte devrait passer par une sensibilisation des éleveurs pour s'assurer qu'ils l'adoptent. C'est en effet une condition sine qua non pour la réussite. Un succès dans la lutte contre la PPCB aurait pour conséquence positive, de diminuer l'utilisation des antibiotiques et ainsi réduire le risque posé par leurs résidus dans l'alimentation.

Pour les régions méridionales du Cameroun (Nord-Ouest, Ouest et Est), une enquête sérologique dans les élevages et la recherche des lésions dans les principaux abattoirs devraient être menées. En fonction des résultats de celles-ci, les stratégies adoptées dans l'Adamaoua ou dans le Nord et l'Extrême-Nord seront appliquées.

Pour pouvoir effectuer des analyses de génomique comparative ou fonctionnelle et d'en déduire des mécanismes de virulence, il faudrait d'abord établir de façon certaine la virulence

des souches étudiées. Bien qu'un certain nombre de ces études aient été publiées et aient apporté des pistes intéressantes, paradoxalement, on peut douter que les souches étudiées aient été parfaitement caractérisées du point de vue de leur virulence. En effet, la plupart du temps, les souches étudiées sont des souches de terrain et il est douteux que la virulence de la souche puisse être évaluée dans ces conditions. Souvent les données cliniques recueillies ont été parcellaires (quand elles ne sont pas nulles) et dans tous les cas, l'expression clinique de la maladie a pu varier d'un élevage à l'autre, d'une région à l'autre, en fonction de la pratique des éleveurs et des vétérinaires qui sont intervenus. La reproduction de la maladie en conditions contrôlées pourrait dans une certaine mesure apporter des réponses quand à la virulence des souches. Cependant, l'expérience montre que, là encore cela est difficile. Au cours d'expérimentations successives, avec la même souche, le taux de mortalité a pu varier très fortement. Une explication tient sans doute à la nature stochastique de la transmission de la maladie dans ce genre d'essais réalisé avec un faible nombre d'animaux et aux variations de la pression d'infection générée par des animaux excréant plus ou moins de mycoplasmes lors de la toux. Enfin, il n'est pas exclu que certains facteurs favorisants modulent l'expression clinique de la maladie. C'est le cas des maladies intercurrentes qui vont moduler la réponse immunitaire innée comme des infestations parasitaires.

C'est pourquoi, il nous a paru indispensable de disposer d'un protocole précis et reproductible permettant de mesurer la virulence des souches de MmmSC.

Nous avons choisi le modèle bovin car c'est le seul animal sensible et qu'il est raisonnable de penser que c'est l'interaction entre MmmSC et le système immunitaire bovin, et surtout de sa capacité à réguler le développement de la réaction primitive d'inflammation, qui est responsable des formes cliniques de la maladie. Le système choisi, l'inoculation par la voie sous-cutanée, permet notamment d'homogénéiser l'inoculum administré à chaque animal. Ce qui contribue à limiter la variabilité des résultats. Il permet également de mesurer la réponse inflammatoire sans recourir à des techniques invasives.

Une étude comparée du pouvoir pathogène des souches de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC a été effectuée avec pour objectifs la validation d'un modèle d'inoculation par la voie sous-cutanée pour une étude de la virulence des souches. Au cours de ces essais, nous avons reproduit au point d'inoculation, la réaction inflammatoire qui se déroule habituellement dans la cage thoracique en cas de PPCB. L'intérêt de cette méthode est qu'elle est reproductible : lors de ces deux essais, la souche pathogène a induit le phénomène de Willems avec des index de virulence élevés. Ce travail nous a permis de valider le modèle

sous-cutané et de le proposer pour des futures études sur la virulence des souches de MmmSC : inoculation par la voie sous-cutanée d'un inoculum de 10^8 UFC à un groupe de 10 bovins et suivi clinique pendant un mois. Des variabilités observées dans les résultats pourraient être dues à des différences entre les inoculums. Pour réduire cette variabilité, la PCR quantitative pourrait être mise à contribution en titrant rapidement les cultures arrivées en phase de croissance exponentielle et en ajustant le titre à 10^8 ou 10^9 mycoplasmes. Des nécroses au point d'inoculation peuvent faire souffrir l'animal. Afin d'éviter ces lésions qui ne sont pas nécessaires à l'appréciation des résultats, la durée de l'expérimentation devra être limitée à trois semaines. A partir de 21 jours, les animaux pourraient être traités aux antibiotiques et anti-inflammatoires et ensuite abattus pour la boucherie après les délais d'attente réglementaires. Le résultat le plus marquant obtenu a été la confirmation que la souche PG1 a réellement perdu son pouvoir pathogène. Nous avons bien pris soin d'utiliser un « stock » de la souche PG1 en provenance de SVA (Suède) qui a servi de base au séquençage. En effet, nous nous sommes rendu compte d'une certaine variabilité au niveau des stocks de PG1 de diverses origines. Ainsi on peut conclure que la séquence génomique publiée en 2004 correspond à une souche non pathogène. Il faudra donc attendre l'obtention de séquences génomiques complètes de souches pathogènes pour espérer obtenir des pistes sur les mécanismes du pouvoir pathogène des souches de MmmSC. Malheureusement le polymorphisme qui sera observé avec la souche PG1 résultera d'un très grand nombre de passages in vitro et il sera difficile d'identifier quelles sont les modifications qui auront un lien direct avec la perte de virulence. L'obtention de mutant d'insertion à partir d'une souche pleinement virulente pourrait alors être une alternative puisque dans ce cas l'inactivation ne portera que sur un gène.

En tout état de cause le protocole d'inoculation que nous avons développé permettra d'obtenir des mesures fiables du pouvoir pathogène des souches et ainsi de faire des comparaisons entre des expérimentations réalisées soit dans des pays différents soit à des dates différentes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdo el M., Nicolet J., Miserez R., Goncalves R., Regalla J., Griot C., Bensaïde A., Krampe M., Frey J., 1998. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet. Microbiol.* **59**: 109-122.
- Angelini S., Deitermann S., Koch H.G., 2005. FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon, *EMBO Rep.* **6**(5):476-481.
- Anonyme. 2001. Arrêté n° 0016/MINEPIA du 15 juin 2001 portant levée de la barrière sanitaire de Mbé. Yaoundé, Cameroun.
- Anonyme. 2004. Cameroon Statistical yearbook 2004. National Institute of Statistics. Yaoundé. 209 p.
- Anonyme. 1983. Décret N° 83/ 479 du 08 octobre 1983 portant création du Laboratoire National Vétérinaire (LANAVET). Yaoundé, Cameroun.
- Anonyme. 2001. Loi n° 006 du 16 avril 2001 portant nomenclature et règlement zoo-sanitaire des maladies du bétail réputées légalement contagieuses et à déclaration obligatoire. Yaoundé, Cameroun.
- Bashiruddin J.B., Taylor T.K., Gould AR., 1994. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *J.Vet. Diagn. Invest.* **6** (4): 428-434.
- Bashiruddin, J. B., R. A. Nicholas, Santini F. G., Ready R.A., Woodward M.J. Taylor T.K., 1994. Use of the polymerase chain reaction to detect mycoplasma DNA in cattle with contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.* **134** (10): 240-1.
- Bischof D., Carole Janis, Edy M. Vilei, Giuseppe Bertoni and Frey J., 2008. Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Type to Bovine Epithelial Cells. *Infection and Immunity.* **76** (1): 263–269
- Bischof D. F. , Edy M. Vilei, Joachim Frey., 2006. Genomic differences between type strain PG1 and field strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Genomics.* **88**: 633-641.
- Blancou J., 1996. Les anciennes méthodes de surveillance et de contrôle de la péripneumonie contagieuse bovine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15** (4), 1241-1262.
- Brandao E., 1995. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains in sheep and goats. *Vet. Rec.* **136**: 98-99.
- Bruderer U., Regalla J., Abdo E.M. Huebschle O.J.B. Frey J., 2002. Serodiagnostic and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.* **84**: 195-205.

Buttery S.H. Lloyd L.C. and Titchen D.A., 1976. Acute respiratory, circulatory and pathological changes in the calf after intravenous injections of the galactan from *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides*. *The Journal of medical Microbiology*. **9** (4): 379-391.

BEAC, 2005. Rapport annuel de la Banque des Etats de l'Afrique Centrale (BEAC), Yaoundé.

Campbell, A. D. et Turner A. W., 1953. Studies on contagious bovine pleuropneumonia of cattle. IV An improved complement fixation test. *Aust. vet. J.* **29**: 154-163.

Cheng X., Nicolet P., Poumarat F. Regalla J., Thiaucourt F., Frey J., 1995. Insertion element IS1296 in MmmSC identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiol.* **141** (12): 3221-3228.

Costas M, Leach R. H., and Mitchelmore D.L., 1987. Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the *Mycoplasma mycoides* cluster' *J. Gen Microbiol* **133**, 3319-3329.

Cottew G.S., 1979. Pathogenicity of the subspecies *mycoides* of *Mycoplasma mycoides* for cattle, sheep and goats. *Zentrabl Bakteriol.* **245** (1-2): 164-170.

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.

Cottew G. S., Breard A., Damassa A. J. Erno H., Leach R. H., Lefèvre P. C. Rodwell A. W. Smith G. R., 1987. Taxonomy of the Mycoides mycoides cluster. *Isr. J. Med. Sci.* **23**, 632-635.

Curasson G., 1942. Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée. Tome II. Maladies microbiennes. Vigot Frères Editeurs. Paris VI.

Dedieu L., V. Balcer-Rodrigues, A. Yaya, B. Hamadou, O. Cissé, M. Diallo, M. Niang., 2005. Gamma interferon producing CD4 T-cells correlate with resistance to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC infection in cattle. *Vet Immunology and Immunopathology*. **107**:217-233.

Dedieu L., Mady V., Léfèvre P.-C., 1994 Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet. Microbiol.*, **42**, 327-339.

De Rochebrune, A. T., 1885. "Sur le Bos tricerus Rochbr. et sur l' inoculation préventive de la péripneumonie épizootique par les Maures et les Peuls de la Sénégambie." *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **100**: 658-660.

De Rochebrune A.T., 1880. Formation de races nouvelles. Recherche d'ostéologie comparée sur une race de bœufs domestiques observée en Sénégambie, *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **91**:304–306.

Doutre, M., 1969. Valeur de l'immunité conférée par deux vaccins lyophilisés préparés à l'aide des souches KH3J et T1. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **72**.

Edward D. G. F., Freundt. E.A. 1956. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 1997-207.

Egwu, G.O., Nicholas, R.A.J., Ameh, J.A. and Bashiruddin, J.B. 1996. Contagious bovine pleuropneumonia: an update. *Veterinary Bulletin*, **66** (9): 875-888.

FAO (Food and Agriculture Organisation):
www.fao.org/statistics/yearbook/vol_1_1/pdf/a01.pdf et
www.fao.org/statistics/yearbook/vol_1_2/pdf

Feil E. J., Li B. C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G., 2004. eBurst : inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.*, **185** (5): 1518-30.

Fischer J. 2006, The origins, spreads and disappearance of Contagious bovine pleuropneumonia in New Zealand. *Aust. Vet. J.* **84** (12): 439-444.

Fitzmaurice J., Sewell M., Manso-Silvan L., Thiaucourt F. McDonald W.L. O’Keefe J. S. 2008. Real-time polymerase chain reaction assays for the detection of members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *N. Z. Vet. J.* **56** (1):40-7.

Frey J., Cheng X., Kuhnert P. and Jacques Nicolet J. 1995. Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas *Gene*, **160**: 95-100.

Gaurivaud P. , Persson A. , Le Grand D. , Westberg J. , Solsona M., Karl-Erik Johansson K. E. and Poumarat F. 2004. Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiol* **150** : 4009–4022.

Gherardi G., Fallico L., Del Grosso M., Bonanni F., D’Ambrosio F., Manganelli R., Palu G., Dicuonzo G., Pantosti A. Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy, 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**:306–312.

GSEP, 2003. Rapport final du Projet de Gestion Sécurisée des Espaces Pastoraux (GSEP), MINEPIA, Yaoundé. Cameroun.

Gilbert F. B., Fromageau A., Gélineau L., Poutrel B. 2006. Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat typing. *Vet. Microbiol.* **117** (2-4):297-303.

Gorelenkov V., Antipov A., Iejnina S., Daraselina N., Yuryev A., 2001. Set of tools for PCR primer design. *Biotechniques*, **31** (6): 1326-30.

Gorton, T. S., Barnett M.M., Gull T., French R. A., Lu Z., Kutish G.F., Adams L.G., Geary S. J. 2005. Development of real-time diagnostic assays specific for *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Small Colony. *Vet. Microbiol*, **111** (1-2): 51-58.

Hotzel, H., Sachse, K., Pflutzner, H., 1996. A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Vet. Microbiol.* **49**: 31-43

Houshaymi, B., Miles R.J. and Nicholas R.A.J. 1997. Oxidation of glycerol differentiates African from European isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (small colony). *Vet. Rec.* **140**: 182-183.

Hozier H.M., 1869. British expedition to Abyssinia, MacMillan (Ed.), London, UK, 271p.

Huebschle Otto J.B., Roger D. Ayling, Kevin Godinho, Obed Lukhele, Georgina Tjipura-Zaire, Tim G. Rowan, Robin A.J. Nicholas, 2006. Danofloxacin (Advocin) reduces the spread of contagious bovine pleuropneumonia to healthy in-contact cattle. *Res Vet Sci* **81**(3): 304-9.

Hudson J. R. and Turner A. W., 1963. Contagious bovine pleuropneumonia: a comparison of the efficacy of two types of vaccine. *Aust. Vet. J.* **39**: 373-385.

Janis Carole. 2006, Contribution à la lutte contre la péripneumonie contagieuse bovine: typage moléculaire par MLVA et inactivation de gènes chez *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small colony. Thèse Doctorat Université Victor Segalen Bordeaux 2.

Johansson, K.-E., Heldtander, M.U., and Pettersson, B., 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16SrDNA primers. *Methods Mol. Biol.* **104**: 145–165.

Killoran, P. B., O'Connell J., Mothershed E.A., Probert W.S., 2006. Rapid laboratory detection of meningococcal disease outbreaks caused by serogroup C *Neisseria meningitidis*. *J. Microbiol. Methods.* **67** (2): 330-8.

Kotokovic B., Friis. N. F., Jensen J.S. and Ahrens P., 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Fingerprinting of Mycoplasma Species. *Journal of Clinical Microbiology.* **37** (10): 3300-3307.

Kusiluka L. J. M, Ojeniyi B., Friis N. F., Kokotovic B. and Ahrens P., 2001, Molecular Epidemiology of Contagious Bovine Pleuropneumonia in Tanzania Based on Amplified Fragment Length Polymorphism and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis *J. Vet. Med.* **48**: 303-312.

Lacher D.W., Steinsland H., Blank T.E., Donnenberg M.S., Whittam T.S., 2007. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J. Bacteriol.* **189**:342–350.

Labonne M., Magrong P., Oustalet Y., 2002. Le secteur de l'élevage au Cameroun et dans les provinces du grand Nord : situation actuelle, contraintes, enjeux et défis. In : Jamin J. Y., Seiny Boukar L., Floret C. (Editeurs Scientifiques). Savanes africaines : des espaces en mutation, des acteurs face à des nouveaux défis. Actes du colloque Prasad, 21-27 mai 2002, Garoua, Cameroun.

LANAVET. 1989, Rapport annuel d'activités, Garoua, Cameroun.

Laval G., 2003. Analyse coût-bénéfice des méthodes de lutte contre la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB). Une application à l'échelle du troupeau dans le district de Boji, West Wellega (Ethiopie). *Epidémiol et Santé Anim.* **43**: 1-9.

Le Goff C. and Thiaucourt F., 1998. A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet. Microbiol.* **60** (2-4): 179-191.

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**: 2993–3000.

Lefèvre P.C., 2000. Contagious bovine pleuropneumonia. In: OIE Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines. 4th edition. Edited by OIE, 12 rue de Prony. 75017 Paris France, 957 p.

Lesnoff M., Géraud Laval G., Bonnet P., Chalvet-Monfray K., Renaud Lancelot R. 2004, A mathematical model of the effect of chronic carriers on the within herd spread of contagious bovine pleuropneumonia in an African mixed crop livestock system. *Prev. Vet. Med.* **62**:101-117.

Lesnoff M, Thiaucourt F., Bonnet P., Bicout D., Balenghien T., Abdicho S., Laval G., Lancelot R. 2002. Modèle conceptuel pour prédire la diffusion intra-troupeau de la péripneumonie contagieuse bovine. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.*, **55** (4) : 253-257.

Li Y., Xin J., Gao Y., Zhang J., Nicholas R.A., Lin Y., 2007. Strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony type isolated in China between 1953 and 1960 show close similarity to strains of the Africa/Australia cluster. *Vet. J.* doi: [10.1016/j.tvjl.2007.08.021](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.021)

Lindley E. P., 1971. Experiences with a lyophilised contagious bovine pleuropneumonia vaccine in the Ivory Coast. *Trop. Animal Health and Prod.* **3** : 32-42.

Lista F., Faggioni G. Valjerac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., Le Doujet C., Gorge O., De Santis R., Carattoli A., Ciervo A., Fasanella A., Orsini F., D’Amelio R. Pourcel C, Cassone A and Vergnaud G., 2006. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple variable-number tandem repeats Analysis. *BMC Microbiol.* **6**, 33.

Lorenzon S., Arzul I., Peyraud A. Hendrikx P, Thiaucourt F., 2003. Molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains. *Vet. Microbiol.* **93**: 319-333.

Lorenzon S., David A., Nadew M., Wesonga H., Thiaucourt F., 2000. Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol. Cell Probes*, **14**: 205-210.

Lorenzon S., Manso-Silvan L., Thiaucourt F., 2008. Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cell Probes*. 2008. **22**: 322-328.

Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., 1998. Multilocus sequence

typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:3140–3145.

Mahillon J., Chandler M., 1998. The Insertion Sequences. *Microbiology and Molecular biology reviews*. **62** (3): 725–774.

Manso-Silvan L., Perrier X., Thiaucourt F., 2007. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 2247-2253.

Manso-Silvan L., Vilei E. M., Sachse K., Djordjevic S. P., Thiaucourt F., Frey J., 2008. Proposal to assign *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and to reclassify *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Accepted in *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

March J. B., Brodlić M., 2000 Comparison of the virulence of European and African isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. *Vet. Rec.* **147**: 20-21.

March J.B., Clark J., Brodie M., 2000. Characterization of Strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Type Isolated from Recent Outbreaks of Contagious Bovine Pleuropneumonia in Botswana and Tanzania: Evidence for a new biotype. *Journal of Clinical Microbiology*. **38** (4): 1419-1425.

March J. B., K. Kerr, B. Lema, 2003. Rapid detection of contagious bovine pleuropneumonia by a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC capsular polysaccharide-specific antigen detection latex agglutination test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**(2): 233-40.

McAuliffe L., Ayling D. R., and Nicholas Robin A.J., 2007. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol Lett.* **276** : 181-188.

Masiga W.N., Domenech J., Windsor R.S., 1996. Manifestations and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev. Off. Int. Epiz.* **15**:1283–1308.

Masiga, W. N., Windsor R. S., 1975. Immunity to contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **97**(18): 350-1.

Mbulu RS., Tjipura-Zaire G., Lelli R., Frey J., Pilo P., Vilei E.M., Mettler Nicholas R.A. Huebschle O.J. 2004. Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1-44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.* **98** (3-4): 229-234.

Meats E., Feil E.J., Stringer S., Cody A.J., Goldstein R., Kroll J.S., Popovic T., Spratt B.G., 2003. Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1623–1636.

MINEPIA-Nord, 1984. Rapport de la délégation provinciale de l'élevage, des pêches et des industries animales du Nord, année 1983-84, Garoua, Cameroun.

MINEPIA-Nord, 1987, rapport de la délégation provinciale de l'élevage, des pêches et des industries animales du Nord, année 1986-87, Garoua, Cameroun.

Mullins, G. R., B. Fidzani, Kolanyane M. 2000. "At the end of the day. The socioeconomic impacts of eradicating contagious bovine pleuropneumonia from Botswana." *Ann. N. Y. Acad. Sci* **916**: 333-44.

Musisi F.L., C. Bamhare C. Belemu,J., Chisembele C., Chitate, F. Kabilika S. S. Kimera S., Kitalyi J., Munsimbwe J., Njau P., 2006. The evolution of CBPP in southern Africa: 2004–2006. In: FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative Group Meeting on CBPP in Africa, Rome, 6-8 November 2006.

Msami H.M., Ponela-Mwelwa T., Mtei B. J., Kapaga A. M., 2001. Contagious bovine pleuropneumonia in Tanzania: current status. *Trop. Anim. Health Prod.* **33** (1): 21-28.

Monnerat M.P., Thiaucourt F., Poveda J.B., Nicolet J. and Frey J., 1999. Genetic and Serological Analysis of Lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology.* **6** (2): 224–230.

Mwambazi L. M., 2008. Comparison of the Sensitivity and Specificity of LppQ-ELISA, c-ELISA and Complement Fixation Test in Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) diagnosis with Post-mortem findings. Report IAEA Research Coordinated Meeting. Du 21 au 25 avril 2008, Bamako, Mali.

Newton L.G., 1992. Contagious bovine pleuropneumonia in Australia: some historic highlights from entry to eradication. *Aust. Vet. J.*, **69**: 306–317.

Njoya A., Bouchel D., Ngo Tama A.C., Moussa C., Martrenchar A., Letenneur L. 1995. Systèmes d'élevage et productivité des bovins en milieu paysan au Nord-Cameroun. Projet Garoua (IRA/IRZV/CIRAD).

Nocard E., Roux E., Borrel A., Salimbieni, Dujardin-Beaumetz E., 1898. Le microbe de la péripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) **12**: 240-262.

OIE (Office International des Epizooties) : <http://www.oie.intel>.

Olsson B., Bolske G., Bergstrom K., Johansson K.E., 1990. Analysis of caprine mycoplasmas and mycoplasma infections in goats using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting, *Electrophoresis*, **11**: 861–869.

Orue J., Memery et Thierry G., 1961. La péripneumonie contagieuse bovine. Le lymphotropisme de *Mycoplasma mycoides*. II. Conséquences sur la pathogénicité et l'immunogénèse. *Rev. Med. Vet. Pays Trop.*, **14**: 43-51.

Osiyemi T.I.O., 1981. The eradication of contagious pleuropneumonia in Nigeria: prospects and problems. *Bull. Anim. Health Prod., Afr.*, **29**: 95-97.

PACE-Cameroun, 2007. Rapport d'activités. Mai 2007. Ministère de l'Élevage, des Pêches et des Industries Animales. Yaoundé, 56 pages.

Perez-Losada M., Crandall K.A., Zenilman J., Viscidi R.P., 2007. Temporal trends in gonococcal population genetics in a high prevalence urban community, *Infect. Genet. Evol.*, **7**: 271–278.

Perreau, P. et Bergeron D., 1963. Emploi de particules de latex dans la sérologie de la péripneumonie des bovidés (réaction d'agglutination indirecte). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **16**: 299-304.

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**: 4131–4142.

Planchenault D., 1992. Enquête productivité du bétail camerounais. Ministère de l'élevage, des pêches et des Industries Animales, Cameroun/CIRAD-EMVT. 249 pages.

Pilo P., Vilei E.M., Peterhans E., Bonvin-Klotz L., Stoffel M.H., Dobbelaere D., Frey J., 2005. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J. Bacteriol.*, **187**: 6824–6831.

Pilo P., Frey J., Vilei Edy M., 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *The Veterinary Journal* **174**: 513–521.

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.

Provost A. et L. Joubert., 1970. *Mycoplasma mycoides* et la péripneumonie contagieuse bovine. Situation parmi les mycoplasmes des animaux. Enseignements épidémiologiques, immunologiques et pathogéniques. *Bull. Soc. Sci. Vét et Méd. Comp.* **72** : 519-630.

Provost A., Perreau P, Breard A., Le Goff C., Martel J., Cottew G.S. 1987. Péripneumonie contagieuse bovine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **6** (3): 565-624.

Provost, A. 1967. Recherches entreprises sur la péripneumonie contagieuse des bovidés au laboratoire de recherches vétérinaires de Farcha, Fort Lamy, Tchad de 1964 à 1966. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **67**: 199-246.

Razin S., Yogev D. and Naot Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular biology Reviews.* **62** (4): 1094-1156.

Regalla J., Caporale V., Giovannini A., Santini F., Martel J.L., Goncalves A.P., 1996, Manifestations and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **15**:1309–1329.

Revell, S. G., 1973. Local reactions following C.B.P.P. vaccination in Zambia. *Trop Anim Health Prod.*, **5** (4): 246-52.

Rodriguez J. L., Ermel W. Richard, Thomas P. Kenny, Dale L. Brooks, Al J. DaMassa, 1997. Polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion for selected members of the “*Mycoplasma mycoides* cluster” and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**:186-190

Rodwell A.W., 1982. The protein fingerprints of mycoplasmas, *Rev. Infect. Dis.* **4** : 8–17.

Roeder P. L., Rweyemamu M. M., 1995. Could antibiotic therapy have a role in a strategy for combating CBPP emergencies in Africa ? Some personal views. In: Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) prevention and control strategies in eastern and southern Africa. Report of the joint FAO EMPRES and OAU-IBAR regional workshop held in Arusha, Tanzania, 4-6 July, 1995.

Saïbou I. 2006. La prise d’otages aux confins du Cameroun, de la Centrafrique et du Tchad: une nouvelle modalité du banditisme transfrontalier. *Polis/R.C.S.P./C.P.S.R.* **13** (1 – 2) : 119-145.

Sawires Y. S., Songer, J. G. 2005 Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, **11** (5): 262-272.

Sheriff D., Piercy S.E., 1952. Experiments with the avianised strain of the organism of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **64**: 615-621.

Shirlaw J.F., 1939. Observations on the existence of contagious bovine pleuropneumonia in British India, with an account of preliminary pathological investigation of cases of this disease reported from Assam. *Indian J. Vet. Sci.* **9**: 139–150.

Smith G. R., 1968. Factors affecting bacteraemia in mice inoculated with *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*. *J. Comp. Pathol.* **78**: 267-274.

Tambi E., Maina O., Ndi C., 2006. An estimation of the economic impact of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev. Sci. Tech.* **25** (3): 999-1011.

Tchotsoua M., Djeumene P., 2002. Evolution du prix de la viande bovine et modification des habitudes alimentaires en milieu urbain au Nord-Cameroun de 1993 à 2002. Université de Ngoundéré, Cameroun. 12 p.

Thiaucourt F., Yaya A., Wesonga H., Huebschle O.J.B., Tulasne J.J., Provost A., 2000. Contagious bovine pleuropneumonia, a reassessment of the efficacy of vaccines used in Africa. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **916**:71-80.

Thiaucourt F., Lorenzon S., David A., Breard A., 2000. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.* **72** :251-268.

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.

Thiaucourt F., Di Maria A., 1992, A new microtitration method for the enumeration of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) vaccines, *Biologicals*. **20**:11–13.

Thiaucourt F., Van der Lugt J.J., Provost A., 2004. Contagious bovine pleuropneumonia, in: Infectious diseases of livestock., J.A. Coetzer, R.C. Tustin (Eds.), Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, pp. 2045–2059.

Thomas A., Linden A., Mainil J., Bischof D. F., Frey J., Vilei V.M., 2005. *Mycoplasma bovis* shares insertion sequences with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: evolutionary and developmental aspects. *FEMS Microbiol Lett.* **245** (2) :249-255.

Totté P., Rodrigues V., Yaya A., Hamadou B., Cisse O., Mahamadou Diallo M., Niang M., Thiaucourt F., Dedieu L., 2008. Analysis of cellular responses to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype associated with control of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Res.* 39:08

Turner, A. W., Etheridge J. R., 1963. Slide agglutination tests in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia. *Aust. vet. J.* **39**: 445-451.

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. *Journal of Bacteriology*, **181**(4): 1319-1323.

Vilei Edy M., Bozena M. Korzac, Joachim Frey, 2006. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. *Vet. Res.* **37**: 779 - 790.

Vilei E. M. and Frey J. 2001. Genetic and biochemical characterization of Glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* **8** (1): 85-92.

Vilei E. M., Frey J., 2004. Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR–REA of the *bgl* locus. *Vet. Microbiol.*, **100** : 283–288

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kupier, and M. Zabeau, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**:4407–4414.

Wesonga H.O., Thiaucourt F., 2000. Experimental studies on the efficacy of T1-SR and T1-44 vaccine strains of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* (Small colony) against a field isolate causing Contagious bovine pleuropneumonia in Kenya – effect of revaccination. *Revue Elev. Méd. Vét Pays Trop.* **53** (4): 313-318.

Wesonga H., Manso-Silvan L., Thiaucourt F., 2003. CBPP vaccine strain T1 44: possible reversion to virulence. In Proceeding third meeting FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative group on Contagious bovine Pleuropneumonia. Rome, 12-14 November 2003.

Westberg J., Persson A., Holmberg A., Goesmann A., Lundeberg J., Johansson K. E., Pettersson B., Uhlen M., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp.

mycoides SC type strain PG1^T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Research* **14**, 221-227.

Westberg J., Persson A., Pettersson B., Uhlén M., Karl-Erik Johansson K.-E., 2002. ISMmy1, a novel insertion sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *FEMS Microbiology Letters*, **208**: 207-213

Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzell J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., Van Etten J., Maniloff J., Woese C.R., 1989. A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas : basis for their classification. 1989. *J. Bacteriol.* **171**(12) : 6455-6467.

Willems L. 1852. Mémoire sur la pleuro-pneumonie enzootique du gros bétail. *Recueil de Médecine Vétérinaire Pratique.* **9**, 401-434.

Windsor, R. S., W. N. Masiga, 1976. The effect of post-vaccinal treatment with the antibiotic tylosin on the immunity produced by the T1 strain of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*. *J Comp Pathol.*, **86**(2): 173-81.

Yaya A., Golsia R., Hamadou B., Amaro A., Thiaucourt F., 1999. Essai comparatif d'efficacité de deux souches vaccinales T1-SR et T1-44 contre la péripneumonie contagieuse bovine. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* **52** : 171-179.

Yaya A., Hamadou B., Yaya D., Abdoukadiiri S., Thiaucourt F., 2000. Inoculation expérimentale de l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine à des chèvres. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, **53** (4): 319-324.

ANNEXE I

Extrait de la loi n° 006 du 16 avril 2001 portant nomenclature et règlement zoo-sanitaire des maladies du bétail réputées légalement contagieuses et à déclaration obligatoire.

Article 13. La vaccination ou le traitement contre les maladies réputées légalement contagieuses est obligatoire sur toute l'étendue de la République du Cameroun. Les conditions de paiement des taxes de service sont fixées par des textes particuliers.

Chapitre III : de la péripneumonie contagieuse bovine

Article 27. Lorsqu'un cas de péripneumonie contagieuse bovine est constaté dans une localité, le Ministre chargé des services vétérinaires prend un arrêté portant déclaration d'infection des locaux, enclos et zone de pacage dans lesquels se trouvent les animaux et déterminant l'étendue de la zone infectée ;

Article 28. : (1). Les animaux contaminés ne doivent pas quitter la zone déclarée infectée avant l'arrêté de levée d'infection.

(2). En cas de « stamping out », l'abattage a lieu dans la localité même, sous la surveillance de l'autorité administrative.

(3) La chair des animaux atteints de péripneumonie contagieuse bovine peut être livrée à la consommation dans la zone infectée si l'état général des malades est jugé satisfaisant par les services compétents. Les abats sont incinérés et enfouis ; les peaux peuvent être livrées au commerce après désinfection.

Article 29. (1) Les animaux atteints de péripneumonie contagieuse bovine sont isolés du reste du troupeau et marqués au feu sur la joue droite de la lettre P.


Article 30. Par dérogation à l'article 29 ci-dessus, les animaux traités peuvent être dirigés à l'abattoir public le plus proche dûment désigné. Toutefois, ils doivent dans ce cas être accompagnés d'un laissez-passer sanitaire.

Article 31. Dans toute la zone déclarée infectée, les animaux sur lesquels la maladie n'aura pas été constatée seront vaccinés ;

Article 32. Pendant la durée de la maladie, l'accès de la zone infectée est interdit aux animaux sains, et toutes les foires suspendues pour éviter la propagation de la maladie.

Article 33. L'arrêté d'infection ne peut être levé qu'à l'expiration d'un délai de trois (03) mois après la mort ou l'abattage du dernier animal malade et après l'accomplissement de toutes les prescriptions relatives à l'immunisation.

ANNEXE II : PROTOCOLE STANDARD DU MODELE D'INOCULATION SOUS-CUTANEE

	UMR15 Inoculation sous-cutanée MmmSC	Mode opératoire Inoculation sous-cutanée MmmSC	Date d'application : 04/12/2008 Code : MO- Bact-xxx Révision : 0.1
---	---	---	---

Désignation	Rédaction	Vérification	Validation
Nom	Yaya A.	Thiaucourt F.	
Fonction	Stagiaire	RTB	Resp Animalerie
Date	04/12/2008	04/12/2008	
Signature			

Objet et domaine d'application

Ce protocole vise à décrire comment étudier la virulence des souches de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC). Le modèle choisi est l'inoculation par la voie sous-cutanée chez les bovins. Il s'adresse aux instituts de recherche travaillant sur la péripneumonie contagieuse bovine et désireux d'homogénéiser leurs modes opératoires en vue d'une meilleure reproductibilité des résultats.

Principe de la méthode

Le principe de ce modèle repose sur l'inoculation d'une quantité fixe de bactéries (10^8) par la voie sous-cutanée. Cela entraîne chez les animaux l'apparition de fièvre et d'un œdème sous-cutané appelé phénomène de Willems. La mesure de cet œdème et du nombre de jours de fièvre permet de calculer un indice de pathogénicité. Dix animaux sont nécessaires afin de minimiser les variations dues à des sensibilités individuelles différentes.

Documents associés

- « Règlement intérieur » animalerie ;

- Avis du comité d'éthique ;
- Protocole de titrage d'une suspension de mycoplasmes ;

Abréviations

PPCB : péripneumonie contagieuse bovine

MmmSC : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

Moyens employés

a) Matériels

Animalerie aux normes et ayant une capacité suffisante pour le nombre d'animaux utilisés.

Couloir de contention permettant un accès simple et sécurisé aux animaux.

Thermomètre pour mesure de la température rectale

Règle permettant de mesurer la taille de l'œdème sous-cutané

b) Réactifs

Bovins pleinement susceptibles à la PPCB. Ils ne devront pas avoir été vaccinés contre cette maladie ni provenir d'une zone où la maladie sévit. Leur nombre est fixé à 10 par groupe. Chaque animal devra être identifié de façon unique et indélébile.

Souches de MmmSC : ces souches devront avoir été cultivées au préalable, récoltées dans leur phase exponentielle de croissance, aliquotées sous un volume de 2 ml après leur avoir ajouté un volume égal de sérum de cheval stérile, congelées à -20°C ou mieux -80°C. Le titre de ces aliquotes devra être établi au préalable et confirmé le jour de leur utilisation. Une souche contrôle positif devra obligatoirement être utilisée à chaque essai. Il faudra utiliser de préférence la souche 8740-Rita dont le pouvoir pathogène a déjà été démontré.

Matériel de laboratoire : seringues, aiguilles, Vacutainers.

Tétracyclines longue action permettant de traiter l'ensemble des animaux.

c) Consignes de sécurité spécifiques

MmmSC n'est pas un agent zoonotique, il n'y a donc pas de consigne de sécurité spécifique. Cependant, la manipulation de bovins ou de sérums bovins présente toujours un risque qui doit être évalué. Les consignes générales d'utilisation de l'animalerie doivent être respectées.

d) Etalon et calibrage

Tous les thermomètres utilisés devront avoir été calibrés par rapport à un thermomètre de référence. Le personnel effectuant les mesures devra être formé.

e) Processus opératoire

- La réception des animaux devra se faire au minimum un mois avant le début de l'essai.
- Le nombre total d'animaux est de $N = 10 \times (n+1)$ où n est le nombre de souches à tester.
- Les animaux seront mis en quarantaine et observés pour vérifier leur bon état. Dès leur réception, ils seront traités avec des tétracyclines et déparasités. Huit jours avant le début de l'essai, ils seront habitués aux manipulations journalières de prise de température.
- A J0, les animaux seront allotés par groupe de 10 de façon aléatoire et une souche attribuée à chaque groupe.
- Chaque animal recevra une injection sous cutanée, à la base de l'encolure, contenant 10^8 UFC de la souche de MmmSC choisie en fonction du groupe. Le jour de l'inoculation une prise de sang sera effectuée.
- Chaque jour, les animaux seront examinés et leur température rectale mesurée et notée sur une feuille d'enregistrement standard. La taille de l'œdème sous-cutané sera mesurée aussi bien dans sa largeur que de sa hauteur.
- Si l'œdème a tendance à envahir le fanon, les animaux recevront un traitement antibiotique.
- Les mesures de température et de taille de l'œdème seront effectuées pendant 21 jours après la date d'inoculation.
- Au terme de cette observation, tous les animaux recevront un traitement antibiotique et ils pourront être éliminés pour la boucherie après un délai d'attente correspondant au produit utilisé.
- Une prise de sang sera effectuée un mois après le jour d'inoculation.

f) expression des résultats

Au terme de l'essai, chaque animal se verra attribué un score « fièvre » et un score « œdème sous-cutané ». La taille de la lésion s'entend comme la taille maximum de l'œdème si celui-ci n'est pas de forme ronde. Le score final, pour chaque animal, sera la somme des deux avec un maximum de 6.

Taille de la lésion	Score
< 5cm	0
5-20cm	1
20-40cm	2
>40cm	3

Nombre de jours de fièvre	Score
0	0
1 à 2	1
2 à 4	2
> 4	3

La fièvre est définie soit par une température rectale supérieure à 39,5°C soit comme une température supérieure à la température maximum mesurée sur tous les animaux du troupeau au cours des 4 jours précédant l'inoculation à J0.

Pour chaque groupe, un graphique sera établi, présentant les résultats individuels des scores de chaque animal dans le groupe.

Même si la distribution des scores ne semble pas Gaussienne, une moyenne sera établie pour chacun des groupes exprimant son indice de pathogénicité moyen.

Le groupe contrôle, inoculé avec la souche 8740-Rita devra présenter une moyenne au moins égale à 4.

L'incertitude des résultats dépend de plusieurs facteurs, d'une part la difficulté à obtenir des animaux dont le statut naïf soit absolument sûr et d'autre part la variabilité individuelle de susceptibilité à la PPCB. Dans tous les cas il faut bien se rappeler que ces mesures ne sont que des approximations dues au faible nombre d'animaux utilisés.

Auto-contrôles :

- L'observation d'une séro-conversion entre J0 et J30, à l'aide d'un test de référence pouvant détecter des anticorps anti MmmSC, permettra de confirmer les résultats observés.
- L'établissement de courbes de températures pour chaque animal permettra de visualiser l'augmentation de température et l'apparition de la fièvre et éventuellement de détecter des problèmes au niveau de la mesure de la température rectale. Habituellement l'inoculation d'une souche pathogène doit entraîner l'apparition d'une fièvre avec des températures supérieures à 39,5-40°C.

ANNEXE III

Article publié dans la revue Veterinary Research

YAYA A., MANSO-SILVAN L., BLANCHARD A., THIAUCOURT F., 2008. Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia. Vet. Res. 39 :14.

Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia

Aboubakar YAYA^{1,2}, Lucía MANSO-SILVÁN¹, Alain BLANCHARD³,
François THIAUCOURT^{1*}

¹ CIRAD UPR15 "Control of animal diseases", OIE & FAO reference laboratory for CBPP, Montpellier, France

² LANAVET, Laboratoire national vétérinaire, Garoua, Cameroon

³ INRA, Université de Bordeaux 2, UMR 1090 Génomique, diversité, pouvoir pathogène, Villenave d'Ornon, France

(Received 4 May 2007; accepted 30 October 2007)

Abstract – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*Mmm*SC) is the etiological agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Although eradicated in most developed countries, the disease reappeared in Europe in the 1990s. This reappearance may have been caused either by importation from sub-Saharan Africa, where CBPP is still endemic, or by the reemergence of virulent strains in Europe, as suggested by earlier studies. A multilocus sequence analysis scheme has been developed to address this issue and, most importantly, to be able to monitor new epidemics. The alignment of the full genome sequence of the reference strain PG1 and the partial genome sequence of a pathogenic strain allowed the identification of polymorphic sites. Nineteen initial loci were selected within housekeeping genes, genes of unknown function and non coding sequences. The suitability of these loci for genotyping *Mmm*SC strains was first tested on six strains of diverse geographic origin. The analyses showed that the published PG1 sequence contained a number of specific polymorphisms that were therefore of no use for molecular typing. Among the eight informative polymorphic loci finally selected, only one (*ftsY*) was positioned within a housekeeping gene. Three main groups and 31 different allelic profiles were identified among 51 strains and strain variants examined. Cluster analysis confirmed that European strains from the 1990s did not originate from Africa. It also showed a genetic link between a European strain isolated in 1967 and those found in southern Africa and Australia. This was in agreement with historical data showing that CBPP was introduced in these regions during colonisation in the 19th century.

***Mycoplasma mycoides* / contagious bovine pleuropneumonia / multilocus sequence analysis / molecular epidemiology**

1. INTRODUCTION

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* SC (*Mmm*SC) is the etiological agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) [33]. This disease belongs to the list of notifiable animal diseases from the World Organisation for Animal Health (OIE) because of its eco-

nomic importance (<http://www.oie.int>). CBPP induces lesions of pneumonia and pleurisy in cattle and domestic buffaloes and, without treatment, mortality rates can reach up to 50%. CBPP gained a worldwide distribution as a result of live animal trade in the middle of the 19th century [11]. The disease was progressively eradicated from many countries in Europe and North America on the eve of the

* Corresponding author: thiaucourt@cirad.fr

20th century thanks to the strict application of stamping out policies. A strategy that combined vaccination campaigns, detection and slaughter of infected animals and control of animal movements allowed Australia to regain a CBPP-free status in 1973 [8]. In sub-Saharan Africa, CBPP was eradicated in the extreme southern part of Africa but remains enzootic elsewhere. The disease was under control in Africa around 1980, when repeated vaccination campaigns were organised to eradicate rinderpest by use of bivalent vaccines that also provided protection against CBPP. However, its prevalence and distribution have extended dramatically since the eradication of rinderpest in 1993, which implies that no more vaccination campaigns have been organised and subsidised [25]. European countries are now free of CBPP, though some of them have experienced sporadic outbreaks at regular intervals. This was the case in Portugal, where CBPP outbreaks were reported in 1935, 1953, and 1993. Outbreaks were also reported at the border between Spain and France in 1967 and 1982, and in Italy in 1993 [34]. On each occasion, field epidemiological inquiries failed to yield clues regarding the origin of the outbreaks and did not permit to elucidate whether they were the result of reintroduction or resurgence of the disease.

MmmSC, the agent of CBPP, belongs to the so-called *Mycoplasma mycoides* cluster, which includes six mycoplasma subspecies and groups of strains that are closely related from both a phenotypic and a genetic point of view [9, 10]. The organisms most closely related to *MmmSC* are *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (*MmmLC*) and *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), which are both etiological agents of contagious agalactia in small ruminants. Recent data have shown that these two subspecies could be grouped into a single entity [45]. Differentiation of the strains belonging to these three taxons is difficult when relying only on the standard growth inhibition technique. Concerning intra-species polymorphism, comparative studies by SDS-PAGE have already shown that strain variability within *MmmSC* is much more limited than within *MmmLC* and *Mmc* [9]. Although *MmmSC* is thought to

be a very homogeneous taxon, previous studies have shown that *MmmSC* strains could be differentiated using molecular typing assays. Analysis of genomic polymorphism by endonuclease restriction of whole genomic DNA showed that different profiles were obtained with *Bam*HI and *Pst*I [31] and that the profiles corresponding to European strains differed from those of African origin. The use of *Hind*III allowed distinguishing various vaccine strains [40]. The evidence of multiple copies of insertion elements present in the *MmmSC* genome allowed the development of new typing tools based on Southern blot hybridisation. The use of IS1296 as a probe allowed the clear differentiation of recent European strains from those of African origin [7]. The observed difference was explained later on by the identification of an 8.8 kbp deletion in the genome of most *MmmSC* strains of European origin [43], resulting in a missing IS1296 band. The use of another insertion element, IS1634, also led to different Southern blot profiles [24, 46] although the high copy number of this insertion sequence (N = 60), as compared to that of IS1296 (N = 28), gave rise to profiles that were difficult to analyse. The use of a technique based on sequencing multiple loci, designated multilocus sequence analysis (MLSA), allowed the identification of 15 different allelic profiles within a representative number of *MmmSC* strains (N = 48) of various origins [22]. In 2004 the whole genome sequence of *MmmSC* reference strain PG1 was published [48], opening new opportunities for the development of typing tools. Analysis of the PG1 genome sequence showed that the loci and primer pairs previously selected for MLSA were not the most adequate. Some of the primers hybridised on multiple sites, whilst other targeted sequences were duplicated in the PG1 genome, hampering result interpretation. Comparison of PG1 sequences with the sequences of a pathogenic *MmmSC* strain, obtained through an ongoing genome sequencing project, allowed the identification of a number of polymorphic sites. The objective of this study was to select a set of polymorphic loci to develop a more precise and robust MLSA scheme in order to type *MmmSC* strains from

Table I. List of strains.

Profiles	Strains	Origin	Locality	Year of isolation	Comments	References	Provided by
A00	Gemu Gofa	Ethiopia	Turmi?	1974			NVI Dr Fikre
A00	83162	Chad	Bougor?	1983			CIRAD
A01	91130	CAR	Bouar?	1991			LCV Bangui, Dr Condolas
A02	Afadé	Cameroon	Afade	1965			LaboFarcha Dr Provost
A02	Vom	Nigeria	Vom?	1965	Sheep origin		Vom Laboratory
A03	B17	Chad	N'Djamena	1959			LaboFarcha Dr Balis
A04	8740	Cameroon	Touroua	1987		[50]	LANAVET, Garoua Dr Tulasne
A04	8740-Rita	Cameroon	Garoua	1987	8740 after passage on cattle		LANAVET, Garoua Dr Yaya
A04	8740/11	Cameroon	Touroua	1987	11th passage		CIRAD
A04	8740/53	Cameroon	Touroua	1987	53rd passage		CIRAD
A04	98029	Benin	Kandi?	1998			Dr Hendrixx
A04	9048	Nigeria	Sokoto?	1990			Labocel Niamey Dr Bloch
A05	Muguga	Kenya	Athi-river	1997		[47]	KARI, Muguga, Dr Wesonga
A05	95014	Tanzania	Shinyanga?	1995			FAO Dr Provost
A05	94111	Rwanda	Kigali	1994			Action Nord-Sud, Mme Isakov
A06	2000-033	Ethiopia	Gimbi	2000			NVRIC Sebata, Dr Sentayou
A07	7721	Mauritania	Tiguent	1997			CNERV, Nouakchott, Dr Brun
A08	96010	Mauritania	Noukchott?	1996			NVRIC Sebata, Dr Sentayou
A09	Fatick	Senegal	Fatick	1968			IEMVT (CIRAD)
A10	99042	Mali	Kolokani?	1999			LCR Bamako, Dr Niang
A11	2000-005	Burkina Faso	Ouagadougou?	2000			LDRV, Ouagadougou, Dr Bado
A12	2003-036	Mali	Segou?	2001			LCV Bamako, Dr Niang
A12	87137-10	Burkina Faso	Banfora	1987			LDRV, Ouagadougou, Dr Rouille
A12	98011	Ivory Coast	?	1998			LCPA Bingerville, Dr Cissé
A12	9050-529-1	Ivory Coast	Korhogo?	1990			LCPA Bingerville Dr Domenech
B01	8988-1	Namibia	Oudangwa	1989			CVL Windhoek, Dr Hennen
B02	97039	Namibia	Rundu?	1994			CVL Windhoek, Dr Huebschle
B02	97041	Botswana	Nata?	1995			CVL Windhoek, Dr Huebschle

all over the world and to elucidate the molecular epidemiology of CBPP.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *MmmSC* strains and isolates

Table I lists the names and origin of the 51 strains and strain variants of *MmmSC* used in this study. The strains, selected in order to cover the entire geographic distribution of CBPP, were isolated from Africa (N = 41), Europe (N = 5), Australia (N = 2), and India (N = 1), whereas the origin of strains Lederle, Asmara, and PG1 is unknown. The oldest strain of known origin was isolated in 1936 (strain V5 from Australia) and the most recent in 2004 (strain 2004-003 from Zambia). The date of isolation of six strains was not precisely known. Although the majority of the isolates were of bovine origin, a few isolates from small ruminants (Vom, 94158 and 99048) were also included.

Strains were grown in a modified Hayflick medium containing sodium pyruvate and glu-

cose [39]. At the end of the exponential phase of growth, 2 mL of culture were centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The pellet was washed once in PBS, and re-suspended in 100 µL of distilled water, to which 150 µL of lysis buffer (100 mM Tris HCl, pH 8.5; 0.05% Tween 20; 0.24 mg/mL proteinase K) were added. Following incubation at 60 °C for 30 min, proteinase K was heat-inactivated at 95 °C for 5 min. Samples in lysis buffer were stored at -20 °C until analysis and they were added to the PCR mix without further DNA extraction.

2.2. Identification of suitable loci for MLSA

Partial genomic sequences of the *MmmSC* pathogenic strain 8740-Rita, obtained from an ongoing whole genome sequencing project, were used to evaluate the polymorphism existing between this strain and the reference strain PG1 (NC_005364). Although the final assembly of the 8740-Rita genome has not yet been obtained, the available contigs encompassed most of the DNA

Table I. Continued.

Profiles	Strains	Origin	Locality	Year of isolation	Comments	References	Provided by
B02	97038	Botswana	?	1995		[1]	CVL Windoek, Dr Huebschle
B03	T2/34	Tanzania	Morogoro?	1956			CIRAD
B03	99048	India	Izatnagar?	1999	Goat origin	[38]	IVRI, Izatnagar, Dr Srivastava
B03	Gladysdale	Australia	Gladysdale	< 1965			CIRAD
B03	Pillai	Sudan	Malakal?	1960			CIRAD
B04	2004-003	Zambia	Sesheke	2004			FAO Dr Amanfu
B05	V5	Australia	?	1938	Vaccine	[6]	CIRAD
B06	Asmara	Eritrea	Asmara	unknown	Vaccine		CIRAD
B07	99021	Tanzania	T1/B	1999	T1 variant	[47]	CIRAD
B07	T1sr	Tanzania	Korogwe?	1951	Vaccine		CIRAD
C01	94158	Portugal	?	1994		[5]	LNIV, Lisboa Dr Brandao
C01	PO2	France	Pyrennees	1981			CIRAD
C01	99065	Italy	Brescia	1992			IZS Teramo Dr Pini
C02	9335-170	Italy	?	1992			IZS Teramo Dr Santini
C03	PO1967	France	Pyrennees	1967			CIRAD
D01	97009	Ethiopia	Makale	1997			NVI Dr Berhe
D02	2003-011	Eritrea	Assab?	2003			MOA Asmara, Dr Tesfaalem
E01	DK32	Senegal	Dakar	unknown	Vaccine	[32]	CIRAD
E02	9373-804	Guinea	Kankan?	1993			LDV Conakry, Dr Condé
F01	PG1	Unknown	?	< 1931	Reference strain		CIRAD
G01	Lederle	Unknown	Puigcerda?	< 1967	Vaccine		CIRAD
H01	Filfil	Senegal	Filfil	1965			CIRAD
I01	KH3J	Sudan	Juba	< 1948	Vaccine	[16]	CIRAD

Localities followed by a ? were chosen to obtain a geographic positioning. CAR = Central African Republic; CIRAD = centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement; CVL = central veterinary laboratory; FAO = food and agriculture organisation; IVRI = Indian veterinary research institute; IZS = instituto zooprofilattico sperimentale; KARI = Kenya agricultural research institute; LABO-CEL = laboratoire central d'élevage; LANAVET = laboratoire national vétérinaire; LCPA = laboratoire central de pathologie animale; LCV = laboratoire central vétérinaire; LDRV = laboratoire départemental de recherche vétérinaire; LDV = laboratoire de diagnostic vétérinaire; LNIV = laboratorio nacional de investigacao veterinaria; MOA = ministry of agriculture; NVI = national veterinary institute; NVRI = national veterinary research institute.

sequences homologous to PG1. Only insertion sequences and large duplicated zones in the PG1 genome, unsuitable for MLSA, were excluded. As a whole, 800 kbp were available for comparison. Alignments were performed using the AlignX program of Vector NTI software (Vector NTI v10.3.0, Invitrogen corporation, Carlsbad, CA, USA). Polymorphic sites were recorded and positioned in the PG1 genomic sequence map. Nineteen polymorphic positions were chosen for initial validation. Seven of them resided in housekeeping genes, six within lipoprotein or transmembrane protein genes and a further six within non-coding sequences and they were all distributed along the entire PG1 genome, as shown in Figure 1. The suitability of these loci for MLSA was first validated by sequencing the homologous regions of five additional *MmmSC* strains: the original PG1 strain used for genome sequenc-

ing in Sweden and four other strains from Europe (PO1967), East Africa (94111), West Africa (Filfil), and Australia (Gladysdale). Eight potentially interesting loci were then chosen for final validation using the whole set of strains (Tab. II).

2.3. PCR and sequencing

PCR was carried out in a 50 µL reaction containing: 0.5 unit of Taq DNA polymerase (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) in its corresponding buffer (including 1.5 mM MgCl₂), 300 µM of dTTP and dATP, 150 µM of dGTP and dCTP, 0.4 µM of each primer and 1 µL of sample diluted 1/100. Amplifications were performed using GeneAmp PCR Systems 2400 and 9700 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Thermal cycling consisted in an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by

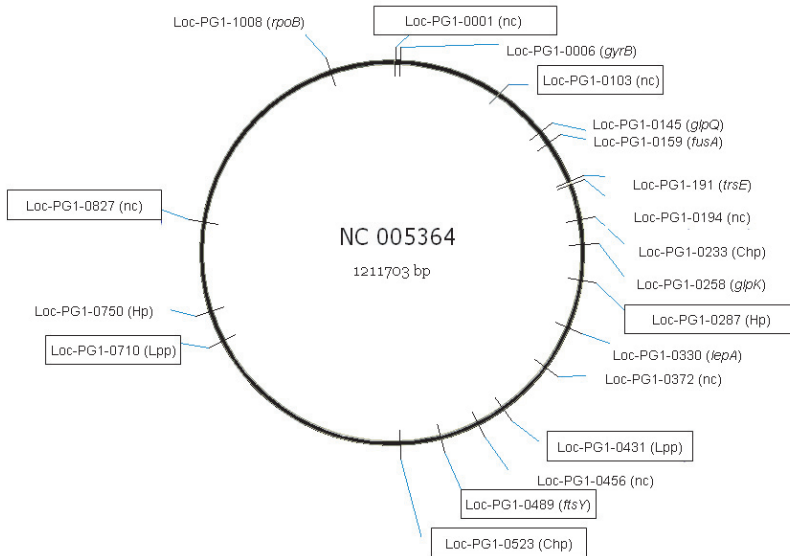


Figure 1. Distribution of polymorphic positions in the PG1 genome (NC_005364) and loci used for MLSA. Polymorphic positions are identified giving the corresponding CDS number in the PG1 sequence. The loci retained for the final MLSA scheme are boxed.

35 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 52 °C for 30 s and extension at 72 °C for 90 s. The final extension step was maintained at 72 °C for 7 min. The size and purity of the amplicons were controlled by electrophoretic separation in 1% agarose gels and samples with relevant features were sent to Genome Express (Genome Express Cogenics, Meylan, France) for sequencing with the corresponding primers. Both forward and reverse strands were sequenced systematically.

2.4. Allelic profile analysis

The sequences obtained from each corresponding forward and reverse primers were assembled using Vector NTI Suite™ (InfoMax, 2001) and the extremities corresponding to single strand sequences or showing aberrant features were trimmed. The sequences obtained from different strains for each locus were aligned using ClustalW (Vector NTI). Polymorphic sites were recorded, carefully checking the corresponding sequence chromatograms. A new allele number was assigned to each change in the nucleotide sequence. In the end, each strain was

characterised by an allelic profile, corresponding to the combination of allele numbers for each of the eight selected loci. This resulted in a matrix comprising 31 different allelic profiles (Tab. III), which was analysed using eBURST V3, a software developed for the analysis of multilocus sequence typing (MLST) datasets¹. Standard parameters were used, except for the number of loci, which was fixed at eight. Each strain was then characterised by a letter, corresponding to its group, followed by a number, corresponding to the allelic profile.

2.5. Molecular epidemiology analysis

When the exact origin of the strain was known, the geographic coordinates were inferred from a dedicated website². When this information was not available, a putative geographic location was assigned to the strain, taking into account the known distribution of CBPP in the country. For example, strains originating from Namibia were positioned north of the veterinary fence that separates CBPP

¹ <http://eburst.mlst.net/v3/>

² <http://earthsearch.net/intSearch/>

Table II. List of primers used for PCR and sequencing. The positions refer to the nucleotide sequence NC_005364 of reference strain PG1.

Loc names	Gene	Primers	Position	Sequences (5'–3')	Amplicon size (bp)
Loc-PG1-0001	nc	Loc-PG1-0001-F	1272	AACAAAAGAGATCTTAAATCACACTTTA	538
		Loc-PG1-0001-R	1809	CCTCTGTTTAACTTCTAGATCAGAAT	
Loc-PG1-0103	Lpp	Loc-PG1-0103-D	121796	GATGGATATAATCTATACTAGCATTTA	1321
		Loc-PG1-0103-F	123116	CCTTATATAGATAAACTCCTCCTTA	
Loc-PG1-0287	nc	Loc-PG1-0287-F	328750	GATTGCTTTAATCAATTTCTTACTGA	545
		Loc-PG1-0287-R	329294	GGATAACCTTGATTTTTTATTTGCTTTA	
Loc-PG1-0431	Lpp	Loc-PG1-0431-F	485201	CAATTCTTTAAATTTGGGTTTGT	608
		Loc-PG1-0431-R	485808	CTTGCAAGAGTATTTAGATTTGATTA	
Loc-PG1-0489	ftsY	Loc-PG1-0489-F	555289	GTTAGTTGTTGAAATGTTAGATAT	756
		Loc-PG1-0489-R	556044	CCCATATCAGTTTGGATTAA	
Loc-PG1-0523	Chp	Loc-PG1-0523-F	597315	ACAGCATTTGATCAAGATTTAAGTAGTT	824
		Loc-PG1-0523-R	598138	TTACCTAGGTGTTTAAAACCTTCATTTG	
Loc-PG1-0710	Hp	Loc-PG1-0711 –F	816093	CCAGTTGAACCATTTATTTTATATACCT	643
		Loc-PG1-0711-R	816735	AAATATAAGTGGTGTGGAATAACA	
Loc-PG1-0827	nc	Loc-PG1-0827-F	940048	AGTTGTACAACCTGTATGAATCTATGATTAT	619
		Loc-PG1-0827-R	940666	CAGGATATACTTCAAAAATTAAGGTTT	

Lpp: Lipoprotein, Chp: conserved hypothetical protein, Hp: hypothetical protein, nc: non coding sequence.

infected regions in the North from CBPP-free zones in the South. Strains were then positioned on a map, displaying group and allele numbers.

3. RESULTS

3.1. Choice of MLSA loci and initial validation

The first objective of this study was to find suitable loci for multilocus sequence analysis of *MmmSC* strains. Nineteen polymorphic sites observed by comparing the genome sequence of *MmmSC* reference strain PG1 with the partial genome sequence of pathogenic strain 8740-Rita were chosen for initial validation. Five strains, including the original PG1 used for genome sequencing in Sweden and four other strains from diverse geographic origins, were used for this initial validation.

Two loci were considered unsuitable because the polymorphisms that were initially observed between PG1 and 8740-Rita were apparently due to errors in the published PG1 sequence. In Loc-PG1-0330 (*lepA*) both the G in position 379030 and the T in position 379050 are actually A. These two modifications result in a single amino acid modification in the deduced protein sequence. In Loc-PG1-0191 (*trsE*), the T in position 227175 should

be deleted and a T should be inserted after position 227214. These changes modify significantly the sequence of the *trsE* product (12 amino acids). Interestingly, when this locus was sequenced in the vaccine strain T1/44, an insertion sequence (IS1634) was found interrupting the *trsE* gene at position 227363. The putative function of the *trsE* gene product is not well known, though it may be involved in the transport of large molecules, intracellular trafficking and secretion. The disruption of *trsE* in strain T1/44 indicates that this gene is not essential, though whether this has contributed to the attenuation of the vaccine strain is yet to be elucidated. Four additional loci were excluded as the polymorphism was found to be limited to the sequence of strain PG1, whereas the other five *MmmSC* strains exhibited identical sequences. Three of these loci were located within the housekeeping genes *fusA* (Loc-PG1-0159), *glpK* (Loc-PG1-0258), and *rpoB* (Loc-PG1-1008), whereas Loc-PG1-0372 corresponded to a non-coding sequence. Another four loci (Loc-PG1-0145, Loc-PG1-0194, Loc-PG1-0456, and Loc-PG1-0750) were eliminated because they did not add to the discriminatory power of Loc-PG1-0489. Loc-PG1-0233 was also excluded, since only

Table III. Matrix showing the various allelic profiles obtained through MLSA analysis of the eight loci.

Profiles	Type strains	Loc-PG1-0001	Loc-PG1-0103	Loc-PG1-0287	Loc-PG1-0431	Loc-PG1-0489	Loc-PG1-0523	Loc-PG1-0710	Loc-PG1-0827
A00	Gemu Gofa	1	2	1	1	2	1	1	1
A01	91130	5	2	1	1	2	1	1	1
A02	Afadé	1	3	1	1	2	1	1	1
A03	B17	1	3	1	1	2	1	1	2
A04	8740	4	3	1	1	2	1	1	1
A05	Muguga.	1	1	1	1	2	1	1	1
A06	2000/033	1	1	1	1	3	1	1	1
A07	7721	1	2	4	1	2	1	1	1
A08	96010	2	2	4	1	2	1	1	1
A09	Fatick	1	2	4	1	4	1	1	1
A10	99042	1	2	4	1	2	2	1	1
A11	2000/005	2	2	4	1	2	2	1	1
A12	87137	3	2	4	1	2	2	1	1
B01	C8988	1	3	1	1	4	3	2	1
B02	970039	1	2	1	1	4	3	2	1
B03	Gladysdale	1	2	1	5	4	3	2	1
B04	2004/003	1	4	1	1	4	3	2	1
B05	V5	1	3	1	5	4	3	2	1
B06	Asmara	1	3	1	1	4	3	1	1
B07	T1SR	1	5	1	1	4	3	1	1
C01	94158	1	2	1	1	5	5	2	2
C02	9335	1	2	1	2	5	5	2	2
C03	PO1967	1	2	1	1	5	3	2	2
D01	97009	4	2	1	1	4	3	1	1
D02	2003/011	4	2	1	1	4	3	1	2
E01	DK32	3	2	1	1	1	1	1	1
E02	9373/804	3	3	1	1	1	1	1	1
F01	PG1	1	2	5	6	6	3	2	2
G01	Lederlé	6	1	3	4	4	4	2	3
H01	Filfli	4	1	2	1	1	1	1	1
I01	KH3J	1	2	1	3	4	1	1	1

two alleles could be defined in this sequence. All strains of European origin, and none of the other, bore allele 2 in this locus, making it a good tag for this origin. It must be noted that PG1, the origin of which is unknown, also displayed allele 2 in this locus. On the contrary, strain Lederle, which had been used as a vaccine in Spain, displayed allele 1, suggesting that it may not be of European origin. Finally, in Loc-PG1-0194, three alleles were defined, though the results were redundant and did not allow a better differentiation of the strains. In the end, eight loci were selected (Tab. II) to perform MLSA on the whole set of *MmmSC* strains.

Interestingly, analysis of sequence variations amongst *MmmSC* strains showed that many coding sequences (CDS) were interrupted in PG1, whereas larger CDS were identified in the other *MmmSC* strains. This was the case of four out of the eight selected loci. The CDS MSC_0103 and MSC_0104 constituted a single CDS of around 370 amino acids, as well as MSC_0287 and MSC_0288, forming a single CDS of 713 amino acids, and MSC_0710 and MSC_0711, which constituted a single CDS of 934 amino acids. The CDS MSC_0827 was extended from 99 to 344 amino acids.

3.2. Robustness of the MLSA

To evaluate the robustness of the method, cultures of pathogenic strain 8740, the same strain at the 11th and 53rd passages and after a passage in bovines (8740-Rita), were analysed. These were considered variants of the same strain, differing only by a few, well characterised, *in vitro* or *in vivo* passages. In addition, three strains (94111, Filfil, Gladysdale) were tested in duplicate at three months of interval. No differences were evidenced either between the duplicates or between the four strain variants differing in the number of passages. This result was important to show that the selected loci were stable over a few passages, implying that the sequence differences were correlated to the natural evolution of the strains *in vivo*. In the case of high mutation rates the signal would be blurred or biased through *in vitro* passage, whereas in the case

of low mutation rates the loci would have been unsuitable for use as molecular epidemiology tools.

3.3. Alleles defined in the different loci

3.3.1. Alleles defined in non-coding sequences

Five alleles were defined in locus Loc-PG1-0287. Two alleles gathered the majority of the strains (46 out of 51), with allele 4 found only in Western Africa, while allele 1 had no geographic specificity.

Three alleles were defined in locus Loc-PG1-0827. Forty-one strains bore the same allele. The other alleles corresponded to strains found in Europe and Africa, as well as PG1.

Six alleles were defined in Loc-PG1-0001, with the greatest variability found among strains from West Africa.

3.3.2. Alleles defined in genes of unknown function: Lipoproteins (*Lpp*) and Conserved hypothetical proteins (*Chp*)

The smallest number of alleles was 2 for locus Loc-PG1-0710. The observed mutation induced an amino acid modification in the predicted putative lipoprotein (L to S). There was a clear geographic segregation of the alleles (Fig. 2). With the exception of strain Pillai, all strains found in inter-tropical Africa bore allele 1.

Four different alleles were defined in Loc-PG1-0523. However, some *MmmSC* strains could not be typed, as this locus was located within the 8.8 kbp deletion that was found to be specific to recent European strains. A fifth allele was therefore created in order to type this last group of strains using eBURST. Interestingly, the only strain of European origin for which this locus could be sequenced, PO1967, bore the same allele as the strains found in southern Africa and Australia. This allele was characterised by six polymorphic positions that differed in other *MmmSC* strains (Tab. IV). This gave more strength to the genetic link demonstrated by this allele.

Five alleles were defined in locus Loc-PG1-0103. They corresponded to a variable number of five to nine trinucleotide repeats (AAT) coding for asparagine (N) within a gene coding for



Figure 2. Geographic distribution of alleles for Loc-PG1-0710. Except for strain Pillai, from Sudan, all strains of African origin display allele 1 in this locus, whilst the others display allele 2. Note that strain PG1, located by the legend, was not positioned on the map because its geographic origin is unknown.

a putative lipoprotein. There was no apparent geographic segregation of the various alleles.

3.3.3. Allele defined in the housekeeping gene *ftsY*

Six alleles were defined in Loc-PG1-0489, corresponding to *ftsY*. The majority of the strains were segregated in two alleles, comprising similar numbers (23 and 18 strains respectively). Allele 2 was found only on *MmmSC* strains from sub-Saharan origin. Allele 4 was displayed by strains from Southern Africa, Australia, and India, as well as by some strains from East Africa. It was also found on one old strain from West Africa and a strain of unknown origin (Lederle), which was formerly used as a vaccine in Europe.

All strains isolated in Europe bore allele 5 on this locus (Fig. 3), strain Lederle, formerly used as a vaccine in Spain, has an unknown origin.

3.4. Strain groups by MLSA analysis

All 51 strains were characterised by an allelic profile and 31 different allelic profiles were identified (Tab. III). The genetic events underlying the description of the various alleles are described in Table IV. Analysis using eBURST allowed the identification of three main groups of strains (comprising 43 strains). Eight strains were included into groups gathering only two strains or considered as singletons. The geographic positioning of the various groups and allelic profiles is shown in Figure 4.

Group A was the largest, including 25 strains (Fig. 5). Thirteen different allelic profiles were clustered within this group. The largest (A04 and A12) gathered up to four strains. Group A strains were found mostly in West and central Africa, though some of them were found in East Africa (Fig. 4). It must be noted that all *MmmSC* strains isolated after 1994 in East Africa presented the same allelic profile (A05).

Group B was the second largest, including 13 strains that were subdivided into 7 allelic profiles (Fig. 6). Group B strains were found in southern Africa, East Africa, Australia and

India (Fig. 4). The most common allelic profile (B03) was shared by four strains of various origins (Australia, Tanzania, Sudan, and India). Most of group B strains found in East Africa had been isolated before 1970 (Pillai, T1sr, T2-34, and a vaccine strain received from a laboratory at Asmara, the origin of which remains undetermined).

Group C corresponded to strains found solely in Europe (Fig. 4 and 6).

Finally, eight strains could not be included into any of the three main groups, as they displayed peculiar allelic profiles. In West Africa peculiar profiles corresponded to old strains isolated in Senegal and Guinea and in East Africa to a vaccine strain (KH3J) also isolated long ago. Two strains isolated recently from northern Ethiopia and Eritrea also bore peculiar allelic profiles. Finally, PG1 was the strain that exhibited the most peculiar allelic profile.

4. DISCUSSION

4.1. Genomic analysis

The objective of this study was to establish a more robust MLSA scheme for *MmmSC* strains based on whole genome sequence comparison. Analysis of PG1 sequences showed that many primers designed on a previous MLSA scheme [22] hybridised at multiple sites or targeted sequences that were duplicated in the PG1 genome. The initial validation of 19 selected loci in this study revealed that sequencing errors may remain in the published PG1 genome. Out of the 19 initial polymorphic loci, two corresponded to sequencing errors. It must be noted that, if this result was extrapolated to the 267 polymorphic sites found between the sequences of strains PG1 and 8740-Rita, there may be around 20 errors in the published PG1 sequence. Another four out of the 19 polymorphic positions seemed to be specific to the PG1 sequence. The peculiarity of the PG1 genome has already been shown. For example, this strain possesses a large DNA repeat of 24 kbp, which is absent in other *MmmSC* strains [3]. The peculiarities of PG1 may be due to a natural divergent evolution of the strain. However, it is difficult to substantiate this hypothesis, since

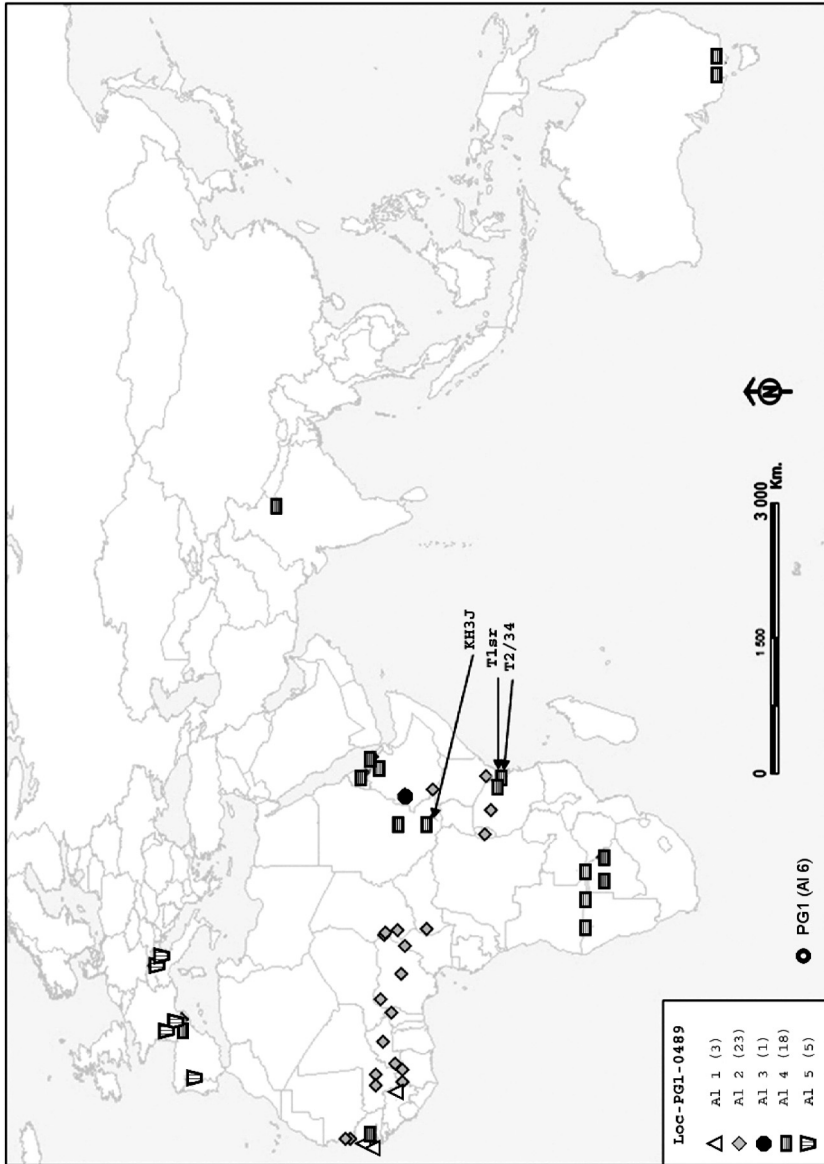


Figure 3. Geographic distribution of alleles for Loc-PG1-0489. Six alleles were defined in this locus. Allele 2 was found only on *MmmSC* strains from sub-Saharan origin. Allele 4 was displayed by strains from Southern Africa, Australia, and India, as well as by some strains from East Africa. It was also found on one old strain from West Africa and a strain of unknown origin (Lederle), which was formerly used as a vaccine in Europe. Note that strain PG1, located by the legend, was not positioned on the map because its geographic origin is unknown.

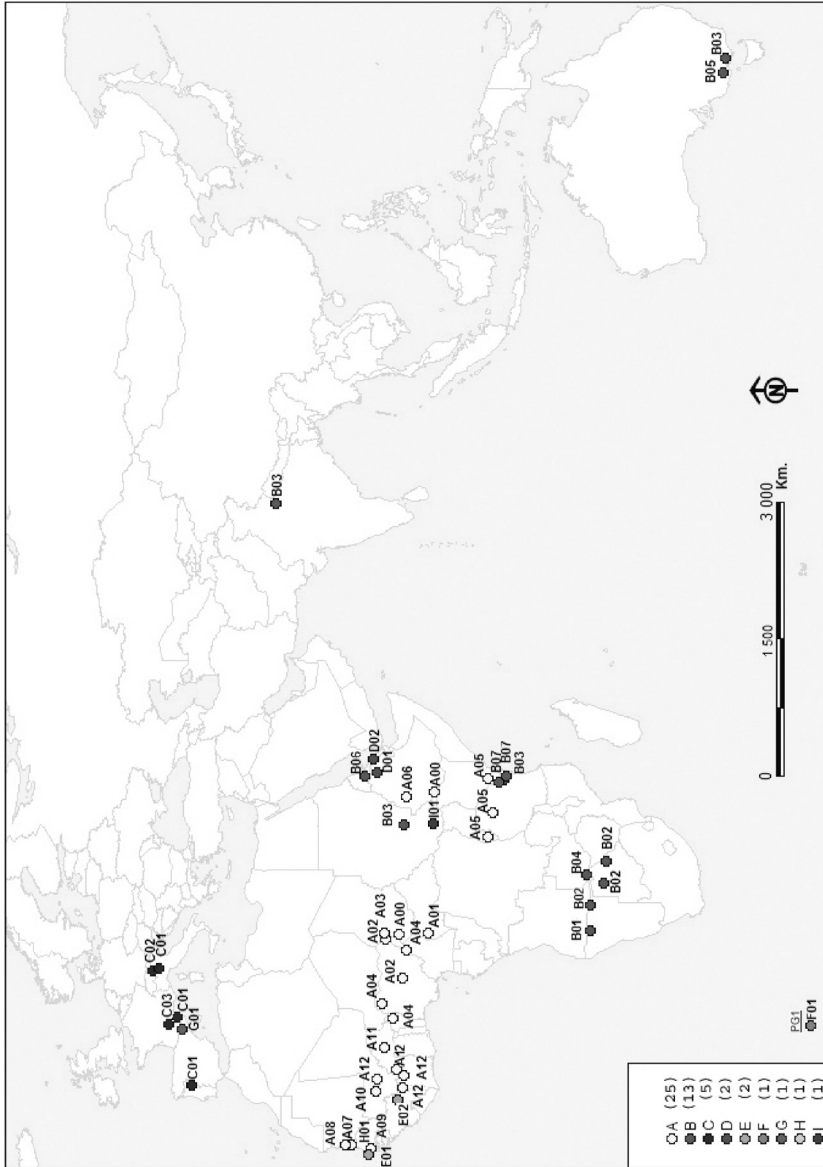


Figure 4. Geographic distribution of allelic profiles. There is a clear correlation between the allelic profile of *MmmSC* strains and their geographic origin. Strains of group A are found in sub-Saharan Africa and nowhere else. This could be an indication that CBPP was present in Africa prior to colonisation time. On the other hand the genomic link between strains from European origin (group C) and those found in Southern Africa, Australia, India and some found in East Africa (group B) can be correlated with historical data describing CBPP expansion during colonisation in the 19th century. Note that strain PG1, located by the legend, was not positioned on the map because its geographic origin is unknown.

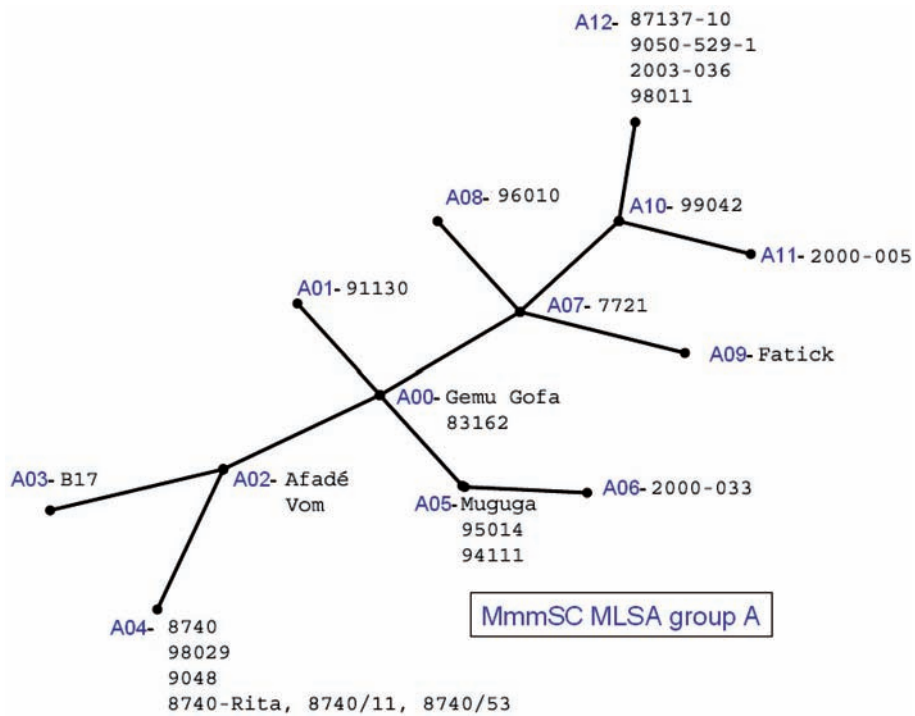


Figure 5. Tree obtained by eBURST for group A strains. Group A is subdivided into 13 allelic profiles and gathers strains found only in sub-Saharan Africa. The largest allelic profile (A12) comprises four strains. However, these strains were collected in neighbouring countries on well known cattle trade routes. This is a likely explanation for finding strains of similar allelic profiles at different locations.

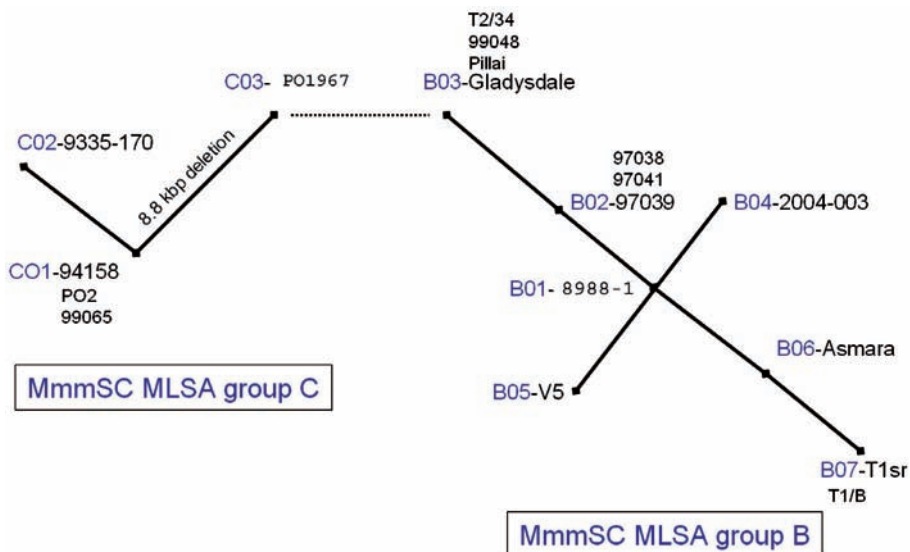


Figure 6. Tree obtained by eBURST for group B and C strains. Group B is subdivided into seven allelic profiles and gathers strains found in Southern and East Africa, as well as strains isolated in Australia and India. Group C gathers European strains. Strain PO1967 is an intermediate between group B and group C.

the exact origin and year of isolation (before 1931) of the strain are unknown. More likely, the divergence of PG1 may result from the many *in vitro* passages. A single house-keeping gene (*ftsY*) was validated for use in the new MLSA scheme. It was noteworthy that polymorphisms in this gene included the presence of duplicated nonanucleotides coding for a stretch of three amino acids (DQQ) present in three to five copies, as well as the deletion of a rather long DNA fragment (35 bp). Since this gene, coding for a bacterial signal-recognition particle receptor, plays a fundamental role in mediating membrane targeting and insertion of nascent proteins [2], it is likely that the polymorphic sites are not positioned on the active sites of this molecule.

4.2. Epidemiological analysis

The presence of group A strains only in West and central Africa may indicate that these strains have evolved separately from those present in Europe. This may also indicate that CBPP existed in the continent prior to colonisation and presumed introduction of CBPP with live cattle. Such a hypothesis was already raised when a traditional “vaccination” procedure, consisting in inoculating pleural fluid subcutaneously at the bridge of the nose, was described in West Africa [4]. The local inflammation generally led to a reaction of the periosteum, with development of a pseudo-horn, which resulted in the erroneous description of a new cattle breed called *Bos tricerus* [35]. These traditional procedures were unknown in Europe, where the inoculation point, as described by Willems, was the tip of the tail [49]. Furthermore, a possible ancestral allelic profile (A00) was identified in strains isolated in Chad and the Gemu-Gofa region in Western Ethiopia. In these regions the influx of exotic cattle was minimal in the 19th century. In contrast, the presence of group B strains in East Africa could reflect an influx of affected cattle from Europe. This may have taken place directly from European countries (i.e. from Italy to its Eritrean colony) or indirectly, as when the 1868 British expedition to Abyssinia used ox carts from India to pull artillery in the

mountainous regions [19] and might have thus introduced CBPP in East Africa.

The geographic location of strains sharing the same allelic profile agreed with known epidemiological data. Therefore, the presence of multiple strains with the same allelic profile certainly does not result from an MLSA lack of discriminatory power. For example, the presence of allelic profile A05 in many countries in Eastern Africa can be explained by a ‘clonal expansion’ of the initial strain of Kenyan origin that led to the re-contamination of countries such as Tanzania and Rwanda in the 1990s [25]. Similarly, the presence of the same allelic profile (A12) in Mali, Burkina Faso, and Ivory Coast is in agreement with the transhumance and trade routes followed by cattle herds that are raised in Sahelian countries and exported to meat markets near large cities in the South.

Although strain PO1967, of European origin, belongs to group C, its sequence in Loc-PG1-0233 showed that it is closely related to Group B strains. The localisation of Group B strains in this MLSA scheme corroborated what was known regarding the transmission of CBPP from Europe to overseas colonies during the 19th century. It is well known that CBPP was exported from Europe to Southern Africa [41], Australia [15, 28], and India [36] at that time. The European strain linked to this group, PO1967, is the oldest strain from our collection, which was isolated in 1967 on the French-Spanish border. This strain may represent the closest relative to the ancestral strains that circulated in Europe in the 19th century. More recent European strains differ from PO1967 notably by a deletion of 8.8 kbp, which includes genes encoding a glycerol transporter that may be associated with *MmmSC* virulence [30, 44]. Unfortunately *MmmSC* strains circulating prior to 1967 in Europe are not available. They could have been used to monitor the genetic drift and to check if they were genetically closer to *MmmSC* strains of Southern Africa.

Recent strains of European origin displayed peculiar alleles that were not observed in non-European strains, notably on Loc-PG1-0233 which was not retained in the MLSA

scheme. This finding indicates further that recent CBPP outbreaks in Europe were not due to a reintroduction, but were more likely to be a resurgence of the disease. This conclusion should be of major concern to European countries, particularly with regards to the widening of EU borders. The unnoticed persistence of *MmmSC* in Europe may be explained either by the existence of another, yet unidentified, reservoir or by the circulation of strains of low-pathogenicity, which may sometimes regain virulence. The presence of *MmmSC* strains in hosts other than cattle and domestic buffaloes has already been described. This is notably the case of goats, from which *MmmSC* strains have been regularly isolated both in Africa and in Europe and in which lesions of CBPP can sometimes be reproduced [13]. In an attempt to examine whether goats may be used in place of cattle as models for CBPP, various inoculation routes were tested by Yaya et al. [51]. Some inoculated goats seroconverted and one animal, inoculated intra-peritoneally, developed lesions. However, the role of goats in the natural epidemiology of CBPP is certainly marginal, if not completely irrelevant. This was evidenced in Botswana in 1994, when this country decided to slaughter the entire cattle population from the infected zone [27]. Although the goat population was not targeted in the stamping-out campaign, the subsequent reintroduction of naive cattle in this country was not followed by CBPP outbreaks, hence showing that goats did not play a significant role in CBPP persistence and long term transmission, at least in this context.

On the contrary, the unnoticed circulation of low-pathogenic *MmmSC* strains in Europe remains a possible explanation for the resurgence of CBPP. It is well known that *MmmSC* strains show various degrees of virulence. However, strain virulence is difficult to measure since (i) there is no small animal model that can mimic the lesions observed in cattle, (ii) endobronchial inoculations in cattle are not always successful, even when using strains that have shown to be highly virulent in the field, and (iii) in-contact transmission trials are usually carried out with a reduced number of animals, which may not guarantee the

evaluation of the strain virulence in a single experiment. This last point has been verified *in silico* with stochastic transmission models showing that successive trials performed with the same initial parameters may lead to very different outcomes [21].

MLST is an unambiguous procedure for characterising isolates of bacterial species based on the sequences of the internal fragments of house-keeping genes [23, 37]. The sequences of approximately 500 bp are normally used, as these can be accurately sequenced on both strands using an automated DNA sequencer. For each house-keeping gene, the different sequences present within a bacterial species are assigned as distinct alleles and each isolate is characterised by an allelic profile, corresponding to the alleles defined in each of the loci. In MLST analyses the number of nucleotide differences found between alleles is disregarded and sequences are given different allele numbers whether they differ at a single or at many nucleotide positions. The rationale for this is that a single genetic event resulting in a new allele can occur by a point mutation, altering only a single nucleotide site, or by a recombinational replacement that will often result in the modification of multiple sites. This typing scheme has been applied successfully to a wide variety of bacterial pathogens such as *Staphylococcus aureus* [14], *Campylobacter jejuni* [12], and *Haemophilus influenzae* [26], to cite only a few. This approach has multiple applications such as phylogeny [18], molecular structure analysis [42], and molecular epidemiology. In molecular epidemiology, MLST can be used to study the evolution of antibiotic resistant strains [17], the temporal trends in strain expansion [29], or the distribution of strains of various lineages within a population [20].

In the case of *MmmSC*, this approach was not successful, since the variability within housekeeping genes was too limited, if present at all. This was the case of the genes *fusA*, *lepA*, and *rpoB*. In terms of an evolutionary perspective this may indicate that *MmmSC* genomes are extremely homogeneous, suggesting that this mycoplasma has adapted very recently to its bovine host. From a practical

point of view, this means that genes of unknown function or non coding sequences had to be selected in this study to differentiate *MmmSC* strains. This is why the strategy has alternatively been named “multilocus sequence analysis”. This typing scheme is less universal than MLST analyses, since the gene targets used were selected for typing strains within a biotype and would not be suitable for typing strains of higher taxonomic ranks. However, like MLST, MLSA has the advantage of being a portable and very robust approach.

This new *MmmSC* typing scheme proved more robust than the previous one developed in our laboratory [22]. No double bands were obtained after PCR amplification, which ensured that PCR products could be sent without any purification step. This was sometimes the case with the previous MLSA. On the contrary, the new scheme allowed the description of 31 profiles instead of only 15 out of a comparable number of strains (51 and 48 respectively).

MLSA analysis may open new perspectives for a better understanding of *MmmSC* genome plasticity. In this respect, it would be very interesting to obtain ancestral DNA from samples of CBPP-affected lungs preserved in formalin for histology. This should allow the characterisation of the ancestral allelic profiles circulating in Europe and Africa and may permit measuring evolution rates for the various loci.

This MLSA strategy may also be applied to better understand CBPP epidemiology, improving thus the surveillance and control of the disease. New loci may be added to increase the discriminating power of the MLSA tool on subsets of strains that are very closely related. Including a large number of strains isolated from goats in various regions of the world would be very interesting in order to examine whether the MLSA profiles of *MmmSC* strains from goat origin are similar or, on the contrary, more closely related to other *MmmSC* strains circulating in the same region. The fact that caprine species may serve as a reservoir should be an incentive to multiply mycoplasma isolation and identification from this host, which is known to harbour my-

coplasmas in the ear canal in the absence of pathological signs. Such a procedure is already in place in France, conducted by an epidemiological network called VIGIMYC, managed by the *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* in Lyon.

The results obtained in this study will be included in a web tool dedicated to molecular epidemiology within an EU-funded project called EPIZONE. This tool should facilitate the dissemination of typing methods for pathogens threatening Europe, allow any laboratory to compare in-house data with large databank sets and, in turn, generate phylogenetic trees and actualised maps, provided that the geographic coordinates of all isolates are known. Such a tool should naturally be linked to the websites of the OIE (<http://www.oie.int/wahid-prod/>) and FAO (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/disease_cbpp.asp), which provide updated information on new outbreaks for notifiable diseases.

Finally, this new MLSA tool will be particularly useful to all countries at risk of CBPP reintroduction or resurgence and to those engaged in eradication campaigns, allowing them to trace back the origin of any remaining CBPP focus.

Acknowledgements. We are indebted to a number of projects that made this study feasible: the AU/IBAR CBPP PACE research project, funded by the European Union (REG/5007/005), the LABOVET PSF project, funded by the French Ministry of Foreign Affairs and the EPIZONE Rex project, funded by the European Union. We are particularly grateful to the French Embassy in Cameroon for supporting the PhD thesis work of Yaya Aboubakar.

REFERENCES

- [1] Amanfu W., Masupu K.V., Adom E.K., Raborokgwe M.V., Bashiruddin J.B., An outbreak of contagious bovine pleuropneumonia in Ngamiland district of north-western Botswana, *Vet. Rec.* (1998) 143:46–48.
- [2] Angelini S., Deitermann S., Koch H.G., *FtsY*, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon, *EMBO Rep.* (2005) 6:476–481.
- [3] Bischof D.F., Vilei E.M., Frey J., Genomic differences between type strain PG1 and field strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type, *Genomics* (2006) 88:633–641.

- [4] Blancou J., Early methods of surveillance and control for contagious bovine pleuropneumonia, *Rev. Sci. Tech.* (1996) 15:1241–1282.
- [5] Brandao E., Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC strains in sheep and goats, *Vet. Rec.* (1995) 136:98–99.
- [6] Campbell A.D., Contagious bovine pleuropneumonia. A report on the use of new antigens for the complement fixation and agglutination tests, *J. Conc. Sci. Ind. Res.* (1938) 11:112–118.
- [7] Cheng X., Nicolet J., Poumarat F., Regalla J., Thiaucourt F., Frey J., Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains, *Microbiology* (1995) 141:3221–3228.
- [8] Clay A.L., Lloyd L.C., The eradication of CBPP from Australia, *Bull. Off. Int. Epizoot.* (1974) 91:533–546.
- [9] Costas M., Leach R.H., Mitchelmore D.L., Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the '*Mycoplasma mycoides* cluster', *J. Gen. Microbiol.* (1987) 133:3319–3329.
- [10] Cottew G.S., Breard A., DaMassa A.J., Erno H., Leach R.H., Lefevre P.C., Rodwell A.W., Smith G.R., Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster, *Isr. J. Med. Sci.* (1987) 23:632–635.
- [11] Curasson G., Péripleurmonie bovine, in: *Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée*, Vigot Frères (Ed.), Paris, France, 1942, pp. 276–353.
- [12] Dingle K.E., Colles F.M., Wareing D.R., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J., Urwin R., Maiden M.C., Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*, *J. Clin. Microbiol.* (2001) 39:14–23.
- [13] Dujardin-Beaumetz E., Transmission de la péripleurmonie des bovidés aux espèces ovine et caprine, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* (1906) 20:449–466.
- [14] Enright M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G., Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* (2000) 38:1008–1015.
- [15] Fisher J., The origins, spread and disappearance of contagious bovine pleuro-pneumonia in New Zealand, *Aust. Vet. J.* (2006) 84:439–444.
- [16] Gambles R.M., Studies on the contagious bovine pleuropneumonia with special reference to the complement fixation test, *Br. Vet. J.* (1956) 112:34–40, 78–86, 120–127, 162–169.
- [17] Gherardi G., Fallico L., Del Grosso M., Bonanni F., D'Ambrosio F., Manganeli R., Palu G., Dicuonzo G., Pantosti A., Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy, *J. Clin. Microbiol.* (2006) 45:306–312.
- [18] Hanage W.P., Kaijalainen T., Herva E., Saukkoriipi A., Syrjanen R., Spratt B.G., Using multilocus sequence data to define the *Pneumococcus*, *J. Bacteriol.* (2005) 187:6223–6230.
- [19] Hozier H.M., British expedition to Abyssinia, MacMillan (Ed.), London, UK, 1869, p. 271.
- [20] Lacher D.W., Steinsland H., Blank T.E., Donnenberg M.S., Whittam T.S., Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling, *J. Bacteriol.* (2007) 189:342–350.
- [21] Lesnoff M., Laval G., Bonnet P., Abdicho S., Workalemahu A., Kifle D., Peyraud A., Lancelot R., Thiaucourt F., Within-herd spread of contagious bovine pleuropneumonia in Ethiopian highlands, *Prev. Vet. Med.* (2004) 64:27–40.
- [22] Lorenzon S., Arzul I., Peyraud A., Hendrikx P., Thiaucourt F., Molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains, *Vet Microbiol.* (2003) 93:319–333.
- [23] Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:3140–3145.
- [24] March J.B., Clark J., Brodlië M., Characterization of strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type isolated from recent outbreaks of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana and Tanzania: evidence for a new biotype, *J. Clin. Microbiol.* (2000) 38:1419–1425.
- [25] Masiga W.N., Domenech J., Windsor R.S., Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa, *Rev.-Off. Int. Epizoot* (1996) 15:1283–1308.
- [26] Meats E., Feil E.J., Stringer S., Cody A.J., Goldstein R., Kroll J.S., Popovic T., Spratt B.G., Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing, *J. Clin. Microbiol.* (2003) 41:1623–1636.
- [27] Mullins G.R., Fidzani B., Kolanyane M., At the end of the day. The socioeconomic impacts of eradicating contagious bovine pleuropneumonia from Botswana, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2000) 916:333–344.
- [28] Newton L.G., Contagious bovine pleuropneumonia in Australia: some historic highlights from entry to eradication, *Aust. Vet. J.* (1992) 69:306–317.
- [29] Perez-Losada M., Crandall K.A., Zenilman J., Viscidi R.P., Temporal trends in gonococcal population genetics in a high prevalence urban community, *Infect. Genet. Evol.* (2007) 7:271–278.

- [30] Pilo P., Vilei E.M., Peterhans E., Bonvin-Klotz L., Stoffel M.H., Dobbelaere D., Frey J., A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony, J. Bacteriol. (2005) 187:6824–6831.
- [31] Poumarat F., Solsona M., Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype small colony, the agent of contagious bovine pleuropneumonia, Vet. Microbiol. (1995) 47:305–315.
- [32] Provost A., Prophylaxis and vaccination in bovine pleuropneumonia. Evolution of techniques and their current practical applications, Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. (1974) 27:145–161.
- [33] Provost A., Perreau P., Breard A., Le Goff C., Martel J.L., Cottew G.S., Contagious bovine pleuropneumonia, Rev.-Off. Int. Epizoot.(1987) 6:625–679.
- [34] Regalla J., Caporale V., Giovannini A., Santini F., Martel J.L., Goncalves A.P., Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe, Rev.-Off. In. Epizoot. (1996) 15:1309–1329.
- [35] Rochebrune A.T. (de), Formation de races nouvelles. Recherche d'ostéologie comparée, sur une race de boeufs domestiques observée en Sénégal, C. R. Acad. Sci. (Paris) (1880) 91:304–306.
- [36] Shirlaw J.F., Observations on the existence of contagious bovine pleuropneumonia in British India, with an account of preliminary pathological investigation of cases of this disease reported from Assam, Indian J. Vet. Sci. (1939) 9:139–150.
- [37] Spratt B.G., Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet, Curr. Opin. Microbiol. (1999) 2:312–316.
- [38] Srivastava N.C., Thiaucourt F., Singh V.P., Sunder J., Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India, Vet. Rec. (2000) 147:520–521.
- [39] Thiaucourt F., Di Maria A., A new microtitration method for the enumeration of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) vaccines, Biologicals (1992) 20:11–13.
- [40] Thiaucourt F., Lorenzon S., David A., Tulasne J.J., Domenech J., Vaccination against contagious bovine pleuropneumonia and the use of molecular tools in epidemiology, Ann. NY Acad. Sci. (1998) 849:146–151.
- [41] Thiaucourt F., Van der Lugt J.J., Provost A., Contagious bovine pleuropneumonia, in: Infectious diseases of livestock., J.A. Coetzer, R.C. Tustin (Eds.), Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, pp. 2045–2059.
- [42] Tourasse N.J., Helgason E., Okstad O.A., Hegna I.K., Kolstø A.B., The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics, J. Appl. Microbiol. (2006) 101:579–593.
- [43] Vilei E.M., Abdo E.M., Nicolet J., Botelho A., Goncalves R., Frey J., Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, Microbiology (2000) 146:477–486.
- [44] Vilei E.M., Frey J., Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence, Clin. Diagn. Lab. Immunol. (2001) 8:85–92.
- [45] Vilei E.M., Korczak B.M., Frey J., *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies, Vet. Res. (2006) 37:779–790.
- [46] Vilei E.M., Nicolet J., Frey J., IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type, J. Bacteriol. (1999) 181:1319–1323.
- [47] Wesonga H., Thiaucourt F., Experimental studies on the efficacy of T1sr and T1/44 vaccine strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC against a field isolate causing contagious bovine pleuropneumonia in Kenya- effect of a revaccination, Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. (2000) 53:313–318.
- [48] Westberg J., Persson A., Holmberg A., Goesmann A., Lundeberg J., Johansson K.E., Pettersson B., Uhlen M., The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP), Genome Res. (2004) 14:221–227.
- [49] Willems L., Mémoires sur la pleuropneumonie épizootique du gros bétail, Recl. Méd. Vét. Pratique, Maisons Alfort, France, (1852) 3:401–434.
- [50] Yaya A., Golsia R., Hamadou B., Amaro A., Thiaucourt F., Essai comparatif d'efficacité de deux souches vaccinales T1/44 et T1sr contre la péripneumonie contagieuse bovine, Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. (1999) 52:171–179.
- [51] Yaya A., Hamadou B., Yaya D., Abdoukadir S., Thiaucourt F., Inoculation expérimentale de l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine à des chèvres, Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. (2000) 53:319–324.

RESUME

La péripneumonie contagieuse bovine, due à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC) sévit de façon enzootique en Afrique. La lutte contre cette maladie dans les pays pauvres se heurte à la faible efficacité des vaccins et aux difficultés d'application des mesures de prophylaxie sanitaire basées sur l'abattage des malades et infectés et le contrôle des mouvements du bétail. Pour les pays indemnes ou qui envisagent l'éradication, il est nécessaire de pouvoir distinguer l'origine des derniers foyers et notamment de savoir s'il s'agit de résurgence ou bien d'importation. A cet effet, un nouveau système de typage a été développé. Il est basé sur une analyse de séquences multilocus (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) pour un typage plus fin des souches de MmmSC et un suivi des foyers de PPCB. Des sites polymorphes ont été identifiés après étude des alignements des séquences de la souche de référence et celles d'une souche pathogène en cours de séquençage. Après validation sur quelques souches, huit locus ont été retenus. Dans un échantillon représentatif de 51 souches de diverses origines, le MLSA distingue trois groupes principaux et 31 profils alléliques différents. Les résultats obtenus montrent sans ambiguïté que les souches d'origine européenne ne résultent pas d'une importation. Le système MLSA a ensuite été affiné avec l'adjonction d'un locus comportant des séquences répétées en tandem (variable number of tandem repeats, VNTR). L'utilisation de deux locus MLSA et un locus VNTR a permis de typer 20 souches isolées au Nord-Cameroun. Les résultats obtenus ont montré une assez grande variabilité des profils de souches, ce qui est en accord avec la situation d'enzootie de la PPCB dans cette région. Finalement un modèle d'étude du pouvoir pathogène des souches de MmmSC a été validé. Il est basé sur une inoculation par voie sous-cutanée des souches de MmmSC et la mesure de la réaction de Willems et l'apparition de la fièvre. Le système est plus reproductible que la méthode de transmission par contact. L'inoculum est facilement contrôlable et les animaux peuvent être récupérés à la fin de l'étude pour la boucherie. En outre, il induit moins de souffrance animale. Les essais ont notamment confirmé que la souche PG1 n'était plus pathogène alors que la souche 8740-Rita l'était pleinement. La principale limitation du modèle reste la variabilité interindividuelle de sensibilité des bovins qui pourrait être diminuée avec l'augmentation du nombre d'animaux par groupe.

Mots-clés :

Péripneumonie, Cameroun, Mycoplasma, Typage moléculaire, MLSA, MLVA, Modèle virulence