

APPLICATION DE L'IMMUNOBLOT A L'ETUDE DES SERUMS DE MOUTONS INFECTES PAR *Mycoplasma Agalactiae*

Reçu le 28/04/2002 – Accepté le 28/06/2003

Résumé

Les mycoplasmes sont à l'origine d'une grande pathologie chez les ruminants. Pour mieux élucider le mécanisme de persistance de ces bactéries dans l'organisme animal, deux expérimentations ont été réalisées avec la souche P89 (*Mycoplasma agalactiae*), à des doses différentes. Cette infection expérimentale nous a permis de suivre en immunoblot l'apparition et la cinétique des anticorps spécifiques et d'identifier les antigènes majeurs : p24, p28, p37-39, p45, p50-54, p74 reconnus par les immunosérums, qui serviront pour des études ultérieures dans les approches vaccinales.

Mots clés: *Mycoplasma agalactiae*, immunoblot, anticorps, antigène majeur, ovins.

Abstract

The mycoplasma are at the origin of a great pathology at the ruminants. To better elucidate the mechanism of persistency of these bacterial in the animal organism, two experiments had been realised with the P89 strain (*Mycoplasma agalactiae*) and different doses.

This experimental infection special to fellow the apparition of the movement of the identification : p24, p28, p37-39, p45, p50-54, p74 recognised by the immunoserums which will survive for the further studies in the approach vaccination.

Keywords: *Mycoplasma agalactiae*, immunoblotting, antibody, major antigen, sheep.

R. KABOUIA
E.H. BERERHI
O. BOUAZIZ
R. AIMEUR

Département des Sciences
Vétérinaires
Université Mentouri
Constantine, Algérie

F. SMATI
Service de Bactériologie
Faculté de Médecine
Université Mentouri
Constantine, Algérie

Les mycoplasmes jouent un rôle important dans la pathologie des petits ruminants entraînant des maladies respiratoires, des arthrites, des kératites et mammites [1]. Ces infections sont à l'origine de pertes considérables dans la production. Les mycoplasmes présentent une grande variabilité antigénique qui leur permet d'échapper au système immunitaire. Leur mécanisme dans l'apparition de ces maladies n'est pas bien connu. Les recherches menées jusqu'à présent visent à les identifier, mais surtout à connaître les caractères des antigènes majeurs qui permettront de distinguer les souches virulentes [2-5].

Cette étude consiste à suivre en immunoblot l'apparition et la cinétique des anticorps chez des ovins infectés expérimentalement par *Mycoplasma agalactiae* à des doses différentes afin de compléter la réponse ELISA, et d'identifier les antigènes majeurs reconnus par les immunosérums.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

a) Origine des sérums

Les sérums ayant servi à notre étude proviennent de deux expérimentations : Myco I et Myco II.

Myco I :

9 agneaux femelles de 5 à 6 mois répartis en 3 groupes (A, B et C) de 3 animaux chacun ont été inoculés avec la souche *Mycoplasma agalactiae* (P89) par voie conjonctivale, avec des doses respectives de 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU (colonies formant unité). Les prises de sang sont effectuées de J - 8 jusqu'à J +28.

Myco II :

ملخص

إن الميكوبلازما هي جراثيم تسبب عدد كبير من الأمراض عند الحيوانات المشتركة. ولفهم ميكانيزمات مكوّن هذه الجراثيم في جسم الحيوان، قمنا بتجارب بيكتريا P89 (*Mycoplasma Agalactiae*) لعينات مختلفة.

سمحت لنا هذه التجارب باستعمال الإمينوبلوط لظهور وتطور الأجسام المضادة الخاصة واكتشاف مولدات الضاد الكبيرة : P24، P28، P37-P39، P45، P50-P54، P74 المعترف بهم بواسطة المصل ولاستعمال دراسات مستقبلية في ميدان التلقيح.

الكلمات المفتاحية: بيكتريا *Mycoplasma Agalactiae*، إمينوبلوط، أجسام مضادة، مولدات الضاد، مشتركة.

1 seul lot de 6 agneaux de 7 mois a été inoculé avec la P89 par la même voie et avec une dose de 10^7 CFU, plus 2 animaux témoins négatifs.

Les prises de sang sont effectuées de J - 8 jusqu'à J +56. Un sérum de mouton témoin à 800 U.I. et 14 sérums de chèvres naturellement infectées, ont également été soumis à l'immunoblot (souche P89, conjugué Mo-PA).

Deux sérums de souris et quatre anticorps monoclonaux obtenus par inoculation de souris avec la P89 ont été utilisés pour le contrôle des antigènes majeurs.

b) Mycoplasmes utilisés

La souche utilisée est *Mycoplasma agalactiae* (P89) d'origine ovine, produite sur un milieu sérum - levure.

Méthodes

a) Purification de l'antigène

Avant d'être utilisé en électro-phorèse et en westernblot, les mycoplasmes sont centrifugés à 10000 tours / mn pendant 30 mn à 7°C. Cette opération de lavage en tampon PBS est réalisée 3 fois de suite. Le culot final est repris dans 1ml de PBS -Ca - Mg et stocké à -20°C.

b) Dosage des protéines

L'antigène, une fois purifié, est dosé par la microméthode « BIO RAD ASSAY ». On mesure la densité optique à 595 nm que l'on reporte sur une courbe étalon établie à partir de différentes dilutions d'albumine bovine.

c) Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont été obtenus par inoculation de souris par le P89.

e) Electrophorèse (SDS-PAGE) [6]

La séparation des protéines est réalisée par SDS-PAGE (gel à 12%, 300 µg de protéine pour un gel de 16 x 18 x 0,15 cm).

f) Westernblot (immunoblot) [7-12]

Le gel de polyacrylamide obtenu est transféré sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière, découpée en fines bandelettes subissent une saturation dans une solution PBS - tween 0,05% - BSA 2% étuvé à 37°C pendant 45',

puis sont mises en contact avec le sérum à tester (dilué à 1/100) suivi d'un rinçage et l'addition de conjugués.

Les conjugués suivants ont été utilisés :

- polyclonal anti IgG de mouton et polyclonal anti IgG de chèvre conjugués à la peroxydase (PO).
- polyclonal anti IgG de souris – PO.
- réactif Protéine G – PO.
- anticorps monoclonal anti IgG de chèvre- phosphatase alcaline (Mo. PA).

Les substrats de révélations étaient, respectivement, pour la peroxydase, le système : DAB + NiCl₂ + H₂O₂, et pour la phosphatase alcaline, le mélange : Fast Red TR sel + Naphtol AS MX phosphatase.

RESULTATS

a) Comparaison des systèmes de révélation

L'apparition de bandes avec les conjugués polyclonaux-PO hors inoculation (sérums témoins ou pré-inoculation) a posé un premier problème de spécificité. Ces bandes disparaissaient en grande partie quand on utilisait le conjugué Protéine G-PO (phénomène identique dans le test ELISA) et totalement avec le conjugué monoclonal (Fig. 1).

Cependant, pour certains sérums il n'y avait pas de différence notable entre les différents systèmes : par exemple, pour le sérum A9 de Myco 1 (10⁹ CFU), l'emploi du monoclonal entraînait seulement une légère diminution de la sensibilité, donc de la précocité d'apparition des bandes, mais la réaction paraissait plus spécifique (disparition de la bande 74 kDa à J -1) (Fig. 2A et Fig. 2B).

De la même façon, malgré l'utilisation de MoPA, nous avons noté la présence des bandes de 45, 50, 54, 66, et 74 kDa avant inoculation chez l'animal N°7 de Myco 2 (Fig. 3A). Il pourrait s'agir, chez cette agnelle, d'anticorps préexistants qui croiseraient avec certains antigènes de *Mycoplasma agalactiae* de poids moléculaire (PM) élevé, ou d'une réaction non spécifique entre les IgG et certains antigènes.

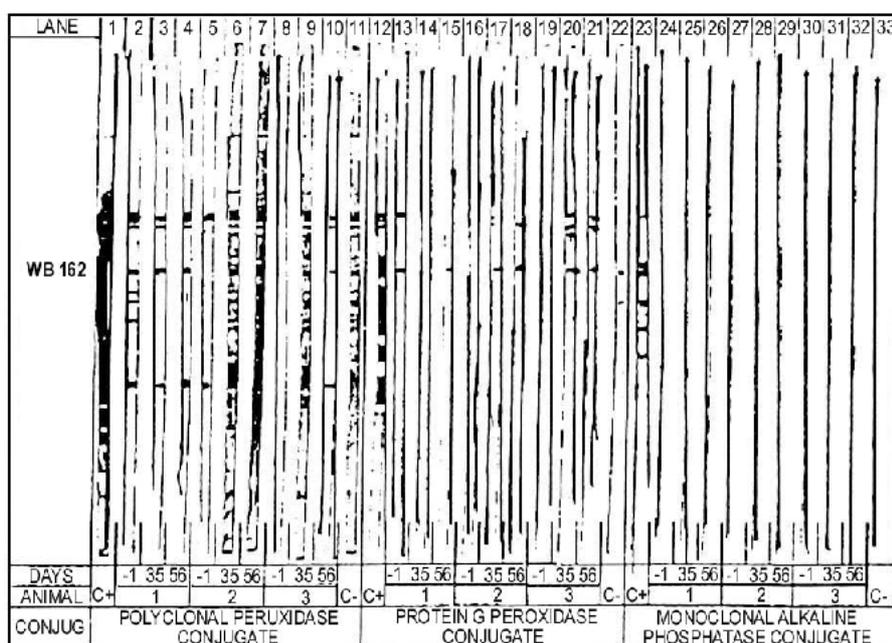


Figure 1:
Etude en immunoblot (antigène *Mycoplasma agalactiae* P 89) des 3 témoins négatifs de l'expérimentation Myco 2, avec 3 conjugués différents: polyclonal - PO, protéine G - PO, Mo-PA. A noter que dans l'ELISA, ces sérums qui étaient positifs avec le conjugué polyclonal-PO sont apparus négatifs avec la protéine G-PO. C+ = témoin sérum positif ; C- = témoin négatif.

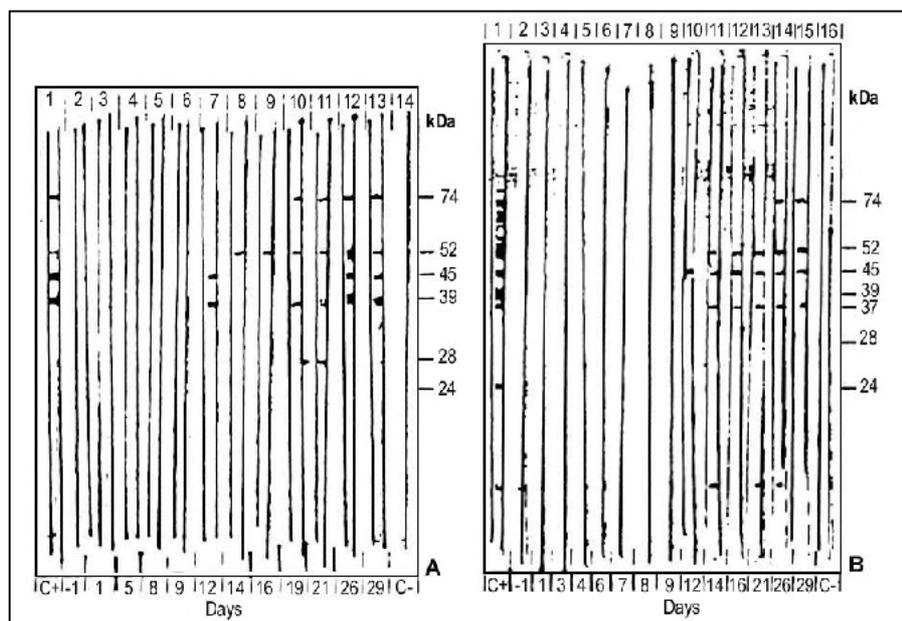


Figure 2:

Immunoblot de l'animal A9 de Myco 1 (10^9 CFU) avec l'antigène P89. Comparaison des bandes obtenues avec deux conjugués différents : polyclonal - PO (Fig.2A), et Mo - PA (Fig.2B) . Le conjugué monoclonal améliore la spécificité au détriment de la précocité (disparition des bandes à J9).

b) Antigènes de *Mycoplasma agalactiae* reconnus par les sérums de moutons expérimentalement infectés *Myco 1* (Fig. 2A, 2B)

Les antigènes majeurs reconnus par les immunosérums étaient les suivants :

- à partir de J 8 - 10 : p 37 - 39
- p 45
- p 52 - 54
- à partir de J 12..... : p 28
- p 24

Une bande à 74 kDa apparaissait plus tardivement. Elle pourrait être spécifique, car elle est fortement représentée pour le sérum témoin positif (C+, mouton naturellement infecté).

Dans cette expérimentation, on a pu remarquer que la réponse en immunoblot était fonction de la dose d'infection : alors que 10^7 CFU provoquaient une plus forte réponse antigénique que la dose de 10^9 CFU, par contre, la réponse était nettement diminuée pour 10^5 CFU.

Myco 2 (Fig. 3A, 3B, 3C)

Le suivi des sérums de trois agnelles inoculées avec 10^7 CFU de P89 (animaux 7, 8 et 9) a apporté des résultats

similaires à ceux de Myco1:

- Apparition des anticorps anti p 37 à J 10
- p 45 et 52 à partir de J11
- p 24 et 28 à partir de J14.

L'intensité de bandes passait par un maximum à J 28 (Fig. 3C1), les animaux étant suivis jusqu'à J 56, date de l'abattage. Un exemple détaillé est présenté dans le tableau 1, indiquant la réactivité avec les composants majeurs.

c) Comparaison avec les anticorps monoclonaux (Fig.3C2)

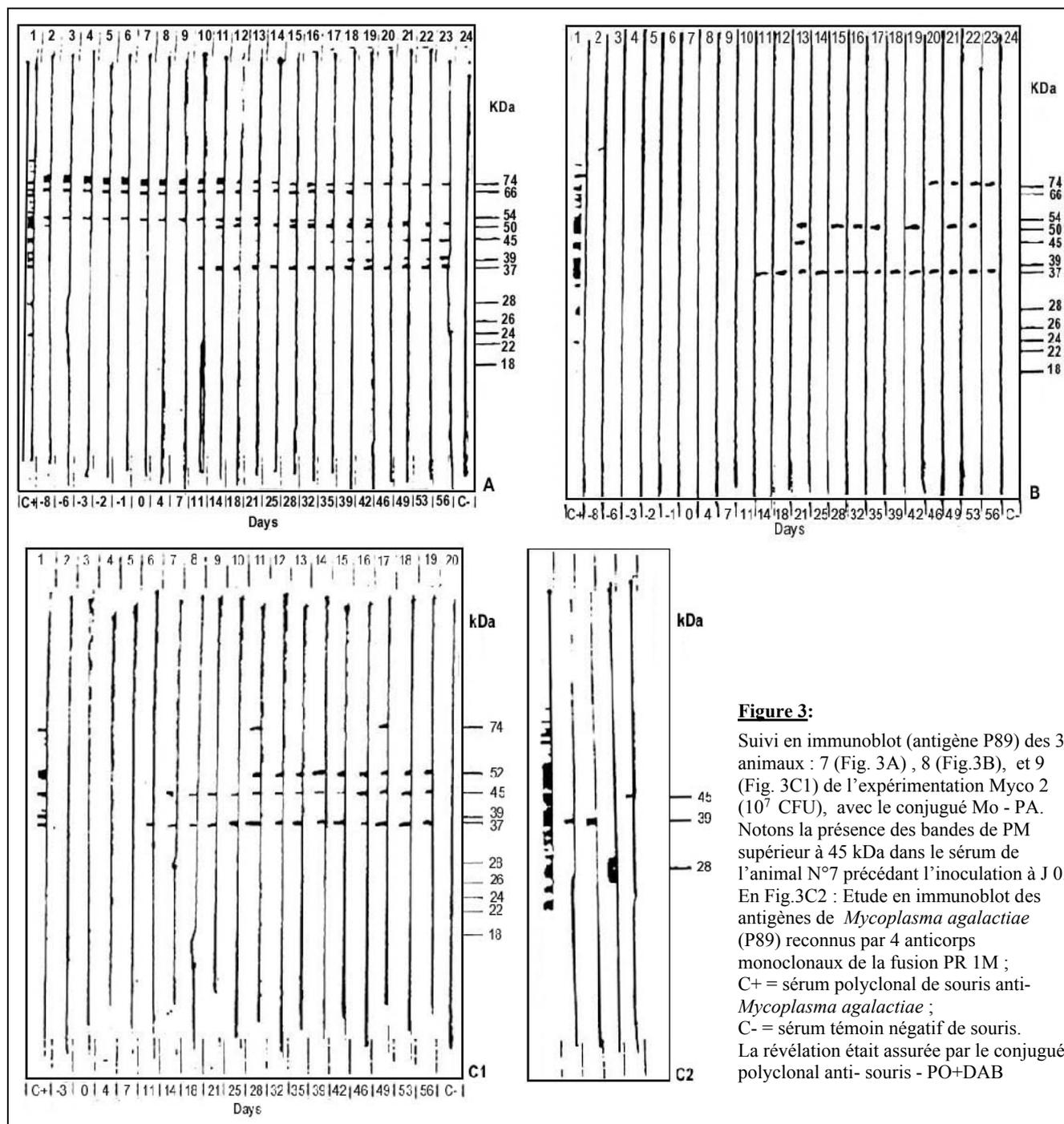
L'utilisation des quatre anticorps monoclonaux a indiqué que ces derniers réagissaient avec les trois antigènes majeurs p28, p39, p45 de *Mycoplasma agalactiae* (P89), qui étaient reconnus à la fois par la souris inoculée (colonne C+) et dans la maladie naturelle et expérimentale du mouton (Fig.3C1).

d) Antigènes de *Mycoplasma agalactiae* reconnus par le sérum du terrain

Les profils obtenus ont montré en première analyse (Fig.4) une bonne concordance entre la présence de bandes (et leur intensité) et les taux U.I relevés en ELISA, avec

EXPERIMENTATION		N° ANIMAL		N° WB		CONJUGUE																
MYCO II		8		159		Mc. Sigma A 8062																
kDa	TEMPS (en jours)																					
	-8	-6	-3	-2	-1	0	4	7	11	14	18	21	25	28	32	35	39	42	46	49	53	56
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50/54	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
37/39	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 1: Réactivité en immunoblot contre les antigènes de *Mycoplasma agalactiae* (P89) des sérums du mouton N°8 de Myco 2 (10^7 CFU) au cours de l'infection expérimentale.



toutefois une plus grande sensibilité pour l'immunoblot, comme pour les sérums des animaux inoculés (présence d'une bande pour certains séronégatifs ELISA). Les bandes majeurs (colonne 3) étaient situées autour de p24, p37- p39, p45, p54, p66, et p74 kDa.

DISCUSSION

Malgré quelques difficultés d'ordre technique [6,8] (choix du conjugué, recherche de l'équilibre entre les différents paramètres de la réaction), l'immunoblot a mis en évidence des antigènes de *Mycoplasma agalactiae* qui ont été nettement et régulièrement reconnus par les sérums des

animaux infectés ainsi que par les anticorps monoclonaux étudiés. Ce sont : p24, p28, p37-39, p45, p50-54, p74.

La persistance de certaines bandes : 76,53-51,44 et 39 qui apparaissent avant l'infection et voient leur réponse amplifiée au cours de l'infection, selon certains auteurs [8,9], le sérum des animaux peut contenir un faible taux d'anticorps dirigés contre les déterminants antigéniques majeurs, due à l'exposition précédente aux mycoplasmes ou à une présence commensale de ces germes qui induisent une faible réponse immunitaire.

La présence de certaines bandes hors inoculation, malgré l'emploi d'un conjugué monoclonal, paraît pour l'instant limiter l'utilisation de cette technique à des suivis

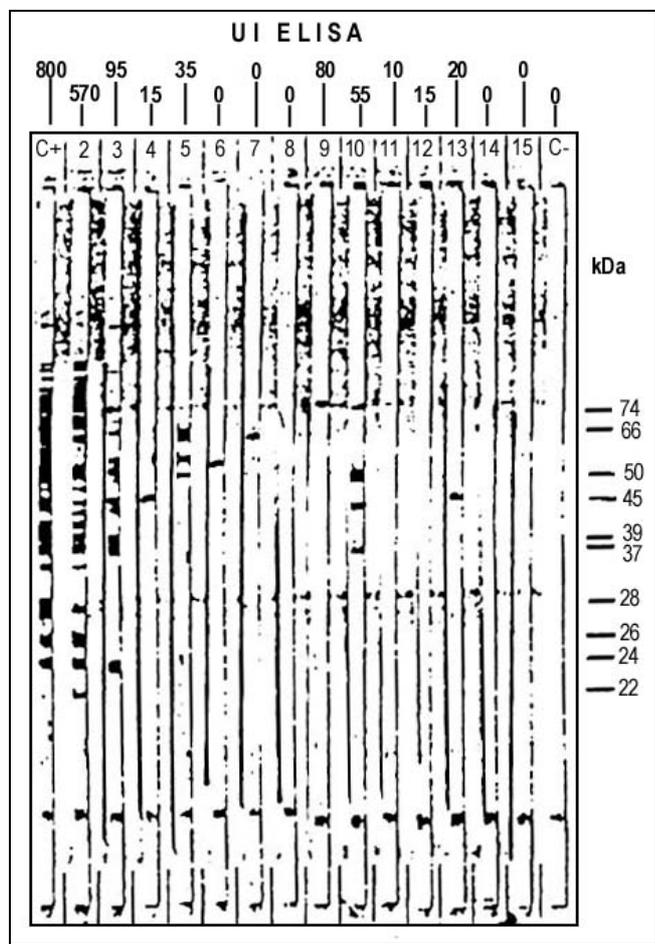


Figure 4: Etude comparative ELISA - Immunoblot sur sérums caprins du terrain. Immunoblot réalisé sur l'antigène *Mycoplasma. agalactiae* (P89) avec des sérums caprins du terrain présentant des titres variés en ELISA (Colonnes 2 à 14). C+ = sérum témoin positif de mouton naturellement infecté ; C- = sérum de mouton témoin négatif.

séquencés dans le temps, lors d'infection expérimentale, quand les résultats de l'ELISA sont négatifs ou douteux, ainsi que pour le screening d'hybridomes lors de la préparation des anticorps monoclonaux .

Le phénomène de variabilité des antigènes de *Mycoplasma agalactiae*, décrit par d'autres auteurs [8,9], ne nous a pas semblé perturber la régularité de ces résultats expérimentaux, à part quelques variations légères des PM relevés. Par contre, dans les profils des sérums de maladie naturelle, des dédoublements de bandes ou des déplacements semblaient apparaître quand la réponse anticorps étaient plus intense.

Les différentes réactions croisées obtenues en immunoblot sont dues à l'espèce produisant le sérum. Ainsi, les sérums souris donnent toujours des intensités colorimétriques importantes, alors que les sérums moutons sont plus nuancés.

Ainsi, les polypeptides communs de *Mycoplasma agalactiae* et *Mycoplasma ovipneumoniae* ont un PM de 76, 53-51, 46, 41 et 39 kDa, et ceux communs à *Mycoplasma agalactiae* et *Mycoplasma arginini* ont pour PM 116, 76, 53-51 et 46 kDa.

CONCLUSION

Le modèle expérimental d'infection par la voie intraconjonctivale avec *Mycoplasma agalactiae* a permis de visualiser grâce à l'immunoblot des antigènes, régulièrement retrouvés, et que l'on peut appeler antigènes majeurs, car également reconnus par les anticorps monoclonaux produits au laboratoire. Ces derniers serviront d'outils pour améliorer les techniques de sérologie, ou dans une optique de clonage ultérieur de ces antigènes, constituant ainsi une avancée dans une approche vaccinale moderne.

REFERENCES

- [1]- Kabouia R., "Isolement des mycoplasmes dans les pneumopathies des petits ruminants", *Maîtrise ès-Sciences Vétérinaires*, (1984), Lyon, 120pp.
- [2]- Franzoso G., Hu P.C., Meloni G.A., Barime M.F., "Immunoblot of chimpanzee sera after infection and immunization and challenge with *Mycoplasma ovipneumoniae*", *Infection and Immunity*, 62, (1994), pp.1008-1014.
- [3]- Ionas G., Clark J.K., Marshall R.B., "The isolation of multiple strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* from individual pneumonic sheep lungs", *Vet. Microbiol.*, 29, (1991), pp.349-360.
- [4]- Ionas G., Norman N.G., Clark J.K., Marshall R.B., "A study of heterogeneity of isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep in New Zeland", *Vet. Microbiol.*, 29 (1991), pp.339-347.
- [5]- Thirkell D., Spooner R.K., Jones G.E., Russell W.C., Voice M.W., "Cross-reacting antigens between *Mycoplasma ovipneumoniae* and other species of mycoplasma of animal origin show by ELISA and immunoblotting with référence antisera", *Vet. Microbiol.*, 26, (1991), pp. 249-261.
- [6]- Sachse K., Grajetszki C., Pfützner H., Hass R., "Comparison of *Mycoplasma bovis* strains based on SDS-PAGE and Immunoblotting Protein Patterns", *J. Vet. Med.*, 39, (1992), pp.246-252.
- [7]- Avakian A.P., Kleven S.H., "The humoral immune reponse of chickens to *Mycoplasma ovipneumoniae* synoviae studied by immunoblotting", *Vet. Microbiol.*, 24, (1990), pp.155-169.
- [8]- Poumarat F., Solsonat M., Boldini M., " Genomic, protein and antigenic variability of *mycoplasma bovis*," *Vet. Microbiol.*, 40,(1994), pp.305-321.
- [9]- Thirkell D., Spooner R.K., Jones G.E., Russell W.C., "The humoral immune reponse of lambs experimentaly infected with *Mycoplasma ovipneumoniae*", *Vet. Microbiol.*, 24, (1990), pp.143-153.
- [10]- Thirkell D., Spooner R.K., Jones G.E., Russell W.C., "Polypeptide and antigenic varibility among strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* demonstrated by SDS-PAGE and immunoblotting", *Vet. Microbiol.*, 40, (1990), pp.241-254.
- [11]- Towbin H., Staeheliin T., "Immunoblotting in the clinical", *Vet. Microbiol.* 27, (1989), pp.495-582.
- [12]- Zanoni C., "Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentaly inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*", *J. Clin. Microbiol.*, 27, (1989), pp.580-582. □

