



Expression de marqueurs fluorescents et d'antigènes viraux chez les mycoplasmes, étude d'interactions avec les cellules de l'hôte

Tiffany Bonnefois

► To cite this version:

Tiffany Bonnefois. Expression de marqueurs fluorescents et d'antigènes viraux chez les mycoplasmes, étude d'interactions avec les cellules de l'hôte. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT028 . tel-01684386

HAL Id: tel-01684386

<https://theses.hal.science/tel-01684386>

Submitted on 15 Jan 2018

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2

Unité de recherche ASTRE

Expression de marqueurs fluorescents et d'antigènes viraux chez les mycoplasmes, étude d'interactions avec les cellules de l'hôte

Présentée par Tiffany BONNEFOIS

Le 22 septembre 2017

Sous la direction de Philippe TOTTE

Devant le jury composé de

M. Philippe TOTTE, PhD, HDR, CIRAD, Montpellier

Mme. Paola PILO, PD, PhD, Institute of Veterinary Bacteriology, Bern

Mme. Christine CITTI, PD, PhD, HDR, ENVT, Toulouse

M. Pascal SIRAND-PUGNET, PhD, INRA, Bordeaux

Mme. Lucía MANSO-SILVAN, DVM, PhD, CIRAD, Montpellier

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Membre invité



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Les mycoplasmes du groupe mycoides, dont notre modèle d'étude *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), sont responsables de maladies chez les ruminants. *Mmm* est l'agent étiologique de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), qui sévit largement en Afrique et entraîne de grandes pertes économiques.

Le contrôle de cette maladie repose principalement sur des vaccins produits empiriquement qui ne confèrent pas une protection suffisamment durable. Une meilleure connaissance des mécanismes de pathogénicité permettrait le développement de vaccins raisonnés plus efficaces. Aussi, plus généralement, le développement de vaccins multivalents permettrait de réduire les coûts liés à la vaccination et améliorerait ainsi le contrôle de ces maladies.

Les objectifs de cette thèse s'inscrivent dans le développement d'outils génériques pour les mycoplasmes, en commençant par l'obtention d'un système permettant l'expression de gènes hétérologues. Cet outil devait permettre la production de mycoplasmes fluorescents adaptés aux études d'interactions avec les cellules hôtes, ainsi que l'expression de valences antigéniques pour une possible utilisation des mycoplasmes en tant que vecteurs vaccinaux.

Nous avons développé un outil pour l'expression de gènes par les mycoplasmes, et ce système a été utilisé pour l'expression de différentes protéines fluorescentes chez *Mmm*, permettant notamment l'observation de colonies vertes, oranges et rouges par microscopie de fluorescence. Cet outil a permis d'obtenir des mycoplasmes fluorescents exprimant des niveaux de fluorescence équivalents chez une espèce phylogénétiquement éloignée, *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), démontrant ainsi la versatilité du système d'expression pour une utilisation plus large chez les mycoplasmes. Les mycoplasmes fluorescents ont ensuite été validés pour l'étude des interactions avec les cellules de l'hôte en démontrant qu'ils étaient bien détectables dans des phagocytes et que leur niveau de fluorescence était suffisant pour permettre l'observation de mycoplasmes individuels à l'intérieur des cellules.

M. bovis, qui est à l'origine d'une pathogénie bien distincte de celle de la PPCB chez les bovins, a aussi été utilisé dans des études fonctionnelles comparatives d'interaction avec les cellules hôtes par titrage et microscopie confocale. Les études réalisées avec des cellules phagocytaires ont montré que *M. bovis* résiste mieux à l'élimination par les macrophages et a une meilleure capacité d'adhérence au support de culture comparé à *Mmm*. Les deux mycoplasmes sont capables de survivre à l'intérieur des phagocytes au moins pendant 3 jours post-infection en l'absence d'opsonisation spécifique. Cette survie intracellulaire a aussi été vérifiée avec des faibles quantités de mycoplasmes en présence de doses bactériostatiques d'antibiotique pour *Mmm*. Les études d'interaction avec des cellules d'une lignée épithéliale embryonnaire pulmonaires bovines (EBL), ont confirmé que seul *M. bovis* était capable d'adhérer aux cellules en grand nombre et d'y pénétrer de façon ponctuelle après deux heures d'infection. Ces résultats devront être confirmés sur d'autres souches virulentes que celles utilisées dans ce travail et avec d'autres types cellulaires. L'outil développé au cours de ce travail permet de mettre en évidence des différences de comportement entre différentes espèces, souches ou mutants de mycoplasmes et leurs cellules hôtes.

L'outil d'expression génique a ensuite été appliqué à la preuve de concept de l'utilisation des mycoplasmes en tant que vecteurs vaccinaux. Pour ceci, le modèle de la maladie virale caprine peste des petits ruminants (PPR) a été utilisé. L'expression du gène H de ce virus par le mycoplasme caprin *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) permettrait ainsi la production d'un vaccin multivalent. L'expression de la protéine H n'a pas pu être mise en évidence chez *Mmc*, bien que, de l'ARNm spécifique ait été détecté, et ceci malgré le recours à une technique très sensible de détection par spectrométrie de masse. Cet échec met en évidence des difficultés à envisager pour l'expression hétérologue de protéines complexes chez les mycoplasmes, ajoutées aux limitations en termes de modifications post-traductionnelles chez ces bactéries, qui devront absolument être prises en considération lors de la sélection des protéines à exprimer.

En conclusion, ces travaux ont ouvert une multitude de perspectives dépendantes du marquage direct des mycoplasmes pour le suivi de leurs interactions avec les cellules hôtes *in vitro* et *in vivo*, mais aussi pour diverses autres applications nécessitant la quantification directe des mycoplasmes.

Mot clés : Mycoplasmes, expression de gènes, fluorescence, vecteur vaccinal, interaction hôte-pathogène.

A mon grand-père,

Remerciements

Je remercie le directeur de l'unité ASTRE du CIRAD de Montpellier, Thierry Lefrançois pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon doctorat.

Je tiens à remercier les Docteurs Paola Pilo et Christine Citti d'avoir accepté d'étudier et de juger cette thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également les docteurs Pascal Sirand Pugnet et Stéphane Bertagnoli d'avoir accepté d'examiner et de participer au jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements vont à mon directeur de thèse Philippe Totté pour son encadrement.

Merci surtout à Lucia Manso-Silvan, encadrante principale de cette thèse pour le soutien, le partage des connaissances et sa disponibilité tout au long de ces trois années.

Mille merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé au laboratoire et avec qui les discussions (plus ou moins scientifiques d'ailleurs) m'ont permis de passer ces trois années dans la joie et la bonne humeur. Un grand merci à Carinne, Cécile, Maxime, Valérie, Virginie, Marie-Stéphanie, Patricia, Isabelle ...

Une mention spéciale pour Rachid avec qui travailler, faire des (multiples) pauses, et se plaindre des manips qui ne marchent pas, m'a permis de décompresser et ne pas voir le temps passer.

Merci également à tous les doctorants et étudiants qui ont animés le bureau G252, Pachka, Faten, Stéphanie, Sarah, Olivia, Antoni...

Merci à tous mes anciens encadrants de stage du DUT au Master qui ont su me faire prendre confiance en moi, me dépasser et me permettre d'arriver jusqu'ici aujourd'hui. Un grand merci surtout à Sabine pour m'avoir fait confiance et laissé autant d'autonomie durant mon stage de Master.

Je tiens surtout à remercier ma famille, et tout spécialement mes parents pour leurs encouragements et leur dévouement tout au long de ces années. Et oui parce qu'il y en a eu

des années, les études « courtes » avec l'obtention du DUT se sont transformées en « longues » avec le DEUST, la Licence, le Master et aujourd'hui le Doctorat ! Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenue.

Merci à mes grands-parents, Papy et Mamie, Pépé et Mémé, pour tout leur amour et leurs petits plats durant toutes ces années.

Merci à ma sœur d'être venue un peu mouvementer mon appartement pendant la thèse et m'avoir supportée toutes ces années.

Un grand merci à ma Doud pour ton soutien et une colocataire à mi-temps bien sympa ;-). Vivement quand même la fin de l'année qu'on parte en vacances dans un pays lointain...

Merci à Thierry, Nadine, Jojo et Jeannine pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à mes amis de Toulouse que j'ai quitté avec tristesse pendant la thèse mais que je revois avec plaisir quand je peux. Mention spéciale à Caro, une binôme de choc et une amie en or.

Merci à Damiano pour les bons moments passés ensemble depuis le DUT et malgré la distance qui nous sépare aujourd'hui.

A Mon Chou, Cédric, mon amour et mon futur mari, merci pour ton soutien et ton amour dans les bons moments comme dans les difficiles. La fin de la thèse nous permet de passer notre histoire à un autre niveau et une nouvelle vie va pouvoir commencer pour nous deux. Je t'aime.

Table des matières

Résumé	2
Remerciements	5
Table des matières	7
Abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	17
Liste des annexes.....	18
Contexte scientifique.....	19
Partie I Introduction générale.....	20
1 La classe des <i>Mollicutes</i> et les mycoplasmoses des ruminants.....	20
I.1. Description générale de la classe des <i>Mollicutes</i>	20
I.2. Présentation du groupe mycoides	26
• Identification et évolution de la classification	26
I.3. Le groupe Hominis (focus sur <i>Mycoplasma bovis</i>).....	30
I.4. Facteurs de virulence des membres du groupe mycoides (modèle <i>Mmm</i>).....	31
• I.4.1. La sécrétion d'H ₂ O ₂	31
• I.4.2. Les lipoprotéines	32
• I.4.3. Les variations antigéniques.....	33
• I.4.4. Les polysaccharides	34
I.5 Facteurs de virulence de <i>M. bovis</i>	35
2 Réponses immunitaires innées de l'hôte vis-à-vis des mycoplasmes	36
3 Principales mycoplasmoses des ruminants.....	38
• Principales mycoplasmoses des bovins	39
4 Prophylaxie et traitements médicaux	43
4.1 Vaccination et prévention.....	43

4.2 Traitements antibiotiques et résistances.....	45
5 Objectifs de recherche.....	47
Partie II Matériels et Méthodes :	48
1. Matériel biologique.....	48
1.1 Souches bactériennes	48
1.2 Cellules bovines :	49
• EBL « Embryonic bovine lung »	49
• Macrophages dérivés de monocytes bovins	49
1.3 Plasmides.....	50
• Le plasposon pMT85/2res	51
• Le plasmide pCJ15	52
• Le plasmide pPS3.1.....	54
• Le plasmide pCC1	55
2. Amplification par PCR	56
• PCR classique.....	56
• PCR pour clonage	56
• Tableau des amorces utilisées au cours de ce travail	57
• Purification des produits PCR.....	58
3. Analyse de l'ARNm des mycoplasmes	58
• Extraction des ARN	58
• Digestion des ADN, analyse de la qualité et quantification des ARN	58
• Transcriptase inverse pour la synthèse d'ADNc	58
• Amplification PCR de l'ADNc.....	59
4. Extraction et purification de l'ADN mycoplasmaïque	59
5. Digestion enzymatique et clonage	59
6. Détermination du lieu d'insertion du transposon	60

7.	Transformation des souches bactériennes	61
•	Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	61
•	Transformation des mycoplasmes	61
8.	Purification et analyse de l'ADN plasmidique amplifié par <i>E. coli</i>	62
9.	Vérification des séquences d'ADN :	63
10.	Analyse des protéines de mycoplasmes	63
•	Extraction et dosage des protéines	63
•	Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes	63
•	Détection des protéines par western-blot	64
•	Détection des protéines par spectrométrie de masse	64
11.	Infection des cellules bovines par les mycoplasmes	65
12.	Analyse des cellules par cytométrie en flux	65
13.	Détermination du titre en mycoplasmes	66
14.	Observation par microscopie à fluorescence et microscopie confocale	66
Partie III Travaux		68
Chapitre 1 Développement et validation d'un système d'expression par complémentation homologue		68
I	Introduction	68
I.1	Outils disponibles pour la manipulation moléculaire des mycoplasmes	69
•	Plasmides réplicatifs utilisés chez les mycoplasmes :	69
•	Plasmides basés sur l'utilisation d'une transposase :	70
•	Promoteurs utilisés pour l'expression de gènes chez les <i>Mollicutes</i> :	72
I.2	Objectifs	73
II	Résultats et discussion	74
II.1	Choix du système d'expression de gènes	74
•	Choix de la cassette d'expression	74

•	Choix du vecteur de clonage :	77
II.2	Développement de systèmes d'expression de gènes	78
•	Système utilisant le plasposon pMT85/2res.....	78
•	Système utilisant le plasmide réplcatif pMYSO1	81
II.3	Validation des systèmes d'expression par complémentation homologue	83
•	Construction pour expression de la lipoprotéine dans le pMT/exp	83
•	Construction pour expression de la lipoprotéine dans le pCC1	84
•	Validation du système d'expression pMT/exp par complémentation homologue ...	86
III	Conclusions et perspectives	88
Chapitre 2 Expression hétérologue de marqueurs fluorescents chez <i>Mmm</i> et <i>M. bovis</i> et validation pour l'étude des interactions avec les cellules de l'hôte		
		91
I	Introduction	91
I.1	Expression hétérologue de protéines fluorescentes chez les mycoplasmes.....	91
I.2	objectifs :	92
II	résultats et discussion.....	93
II.1	choix des protéines fluorescentes et synthèse de gènes optimisés	93
II.2	Construction des différents plasposons pMT/fluo	96
II.3	Obtention et criblage des différents mutants fluorescents	97
II.4	Caractérisation des mutants	100
•	Caractérisation du niveau de fluorescence chez <i>Mmm</i> et <i>M. bovis</i> pour démontrer la versatilité du système d'expression.....	100
•	Vérification de l'intensité de fluorescence émise par les mycoplasmes inactivés. .	104
•	Caractérisation du lieu de l'insertion	105
II.5	Démonstration de l'utilité des mycoplasmes fluorescents pour l'étude des interactions avec les cellules de l'hôte <i>in vitro</i>	106
III	Conclusions et perspectives	110

Chapitre 3 Etude des interactions entre mycoplasmes et cellules de l'hôte	113
I Introduction	113
I.1 Adhérence :	113
I.2 Invasion cellulaire et persistance	115
I.2.1 Interaction avec les cellules non phagocytaires.....	115
I.2.2 Interaction avec les phagocytes	116
I.3 Objectifs	117
II Résultats et discussion.....	117
II.1 Etude de la survie des mycoplasmes en présence de macrophages dérivés de monocytes bovins <i>in vitro</i>	117
II.1.1 Evaluation de la cytométrie en flux pour l'analyse de la cinétique d'infection des macrophages par les mycoplasmes.....	117
II.1.2 Effet dose sur la survie des mycoplasmes sous forme adhérente après lavage	120
II.1.3 Effet dose sur la survie des mycoplasmes sous forme fixée et en suspension.....	125
II.1.4 Test de protection aux antibiotiques pour analyser la survie des mycoplasmes à l'intérieur des macrophages.....	127
II.1.5 Utilisation de la microscopie confocale pour l'étude des interactions entre <i>M. bovis</i> et <i>Mmm</i> et les macrophages bovins.....	129
II.2 Utilisation des mycoplasmes fluorescents pour déterminer l'adhérence aux cellules stromales (non phagocytaires).....	141
III Conclusions et perspectives :	143
Chapitre 4 Expression hétérologue d'antigènes viraux chez les mycoplasmes	146
I Introduction	146
I.1. La peste des petits ruminants	147
II Résultats	151
II.1. choix des modèles d'étude pour la preuve de concept d'un vaccin recombinant mycoplasme - PPRV	151

• Choix du mycoplasme modèle	151
• Choix de la protéine virale et analyse structurale des domaines protéiques	151
• Synthèse de la protéine virale	152
II.2 Obtention de mutants <i>Mmc</i> H-PPRV	154
• Réalisation des constructions pMT/Hopt et des pMT/Hopt-PS-myc	154
• Transformation de <i>Mmc</i> et criblage des mutants	154
II.3. Vérification de l'expression de la protéine H-PPR par immunodétection classique ..	155
II.4. Vérification de la stabilité de l'insertion	156
II.5. Vérification de la transcription	157
II.6. Vérification de l'expression par spectrométrie de masse	158
III Conclusion et perspectives	159
Partie III Conclusions et perspectives générales	162
Article	168
Annexes	182
Références bibliographiques	186

Abréviations

A, C, T, G, U	Adénine, Cytosine, Thymine, Guanine, Uracile
ADN	Acide Déoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
CDS	Séquence Codante (Coding Sequence)
CPS	Polysaccharides Capsulaires (Capsular Polysaccharides)
ELISA	Dosage d'immuno-absorption par enzyme liée (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EPS	Exopolysaccharide
HPLC	Chomatographie en phase liquide haute performance
IC	Inhibition de Croissance
IS	Séquence d'Insertion
kDa	kilo Dalton
Mab	Anticorps Monoclonaux (Monoclonal Antibodies)
MEM	milieu essentiel minimum d'Eagles
Mpb	Méga paires de bases
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>Mmm</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>
<i>Mmc</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
<i>Mcc</i>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
<i>Mccp</i>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
<i>M. leachii</i>	<i>Mycoplasma leachii</i>
MOI	multiplicity of infection (multiplicité d'infection)
MCS	multiple cloning site ou site de clonage multiple
NTP	Nucléoside TriPhosphate
PBS	Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)

PEG	Poly <u>é</u> thlène Glycol
PPCB	Péri <u>p</u> neumonie Contagieuse Bovine
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PPCC	Pleuro <u>p</u> neumonie Contagieuse Caprine
PPLO	Pleuropneumonia like Organism
SDS-PAGE	Electrophorèse en conditions dénaturantes (Sodium Dodécyl-Sulfate – Poly <u>a</u> crylamide Gel Electrophoresis)

Liste des figures

Figure 1 : Microscopie électronique à transmission de cellules mycoplasmiques. _____	21
Figure 2 : Observation de colonies de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> cultivées en milieu gélosé. _____	22
Figure 3: Historique de la découverte des mycoplasmes _____	24
Figure 4 : Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes _____	25
Figure 5 : Arbre phylogénétique du groupe <i>mycoides</i> _____	29
Figure 6 : Représentation schématique des potentiels mécanismes de virulence de Mmm. _____	32
Figure 7: Carte génétique du plasposon pMT85/2res _____	51
Figure 8 : Carte génétique du plasmide résolutif pCJ15 _____	52
Figure 9 : mécanisme de mutagenèse aléatoire non marquée pMT85/2res couplé à pCJ15. _____	53
Figure 10 : Carte génétique du plasmide réplicatif pPS3.1. _____	54
Figure 11 : Carte génétique du plasmide réplicatif pMYSO1. _____	54
Figure 12 : Carte génétique du plasmide réplicatif pCC1. _____	55
Figure 13 : Séquences promotrice, terminatrice et site de clonage multiple utilisées dans la cassette pour l'expression de gènes chez les mycoplasmes. _____	76
Figure 14 : « Overlap » PCR pour l'obtention de la cassette Ptuf-site de clonage multiple-Tfib. _____	80
Figure 15 : Obtention du vecteur d'expression pMT/exp par clonage dans le pMT85/2res _____	81
Figure 16 : Stratégie de clonage de la cassette d'expression dans le vecteur réplicatif _____	82
Figure 17 : clonage de la lipoprotéine Lpp de Mmm dans le pMT/exp pour l'obtention du pMT/Lpp. _____	84
Figure 18 : Stratégie de clonage de la lipoprotéine Lpp de Mmm dans le plasmide réplicatif pCC1 prévu pour le clonage et l'expression de gènes chez Mmm _____	85
Figure 19 : Western Blot des protéines des souches Rita, Rita RΔK-et RΔK- complémenté avec le système pMT/Lpp _____	88
Figure 20 Obtention des pMT/fluor par clonage _____	96
Figure 21 : Photographies prises au microscope à fluorescence de colonies de Mmm _____	97
Figure 22 : Photographies prises au microscope à fluorescence de colonies de <i>M. bovis</i> . _____	98
Figure 23 : photographie prise en microscopie confocale d'une culture de Mmm exprimant mNeonGreen. _____	99
Figure 24: Comparaison des niveaux de fluorescence de colonies de Mmm _____	102
Figure 25 : Analyses de la fluorescence en cytométrie en flux de <i>M. bovis</i> ou Mmm _____	103
Figure 26 : Microscopie confocale de macrophages bovins infectés durant 30 minutes avec des mycoplasmes fluorescents. _____	107
Figure 27 : Analyse de macrophages bovins infectés par des mycoplasmes fluorescents en cytométrie en flux. _____	109
Figure 28 : Analyse en cinétique de la présence de mycoplasmes associés aux macrophages bovins par cytométrie en flux. _____	119
Figure 29 : Quantification de mycoplasmes vivants au cours du temps en présence de macrophages bovins. Les macrophages bovins (MΦ) ont été infectés durant 30 minutes avec <i>M. bovis</i> Oger2 ou Mmm Rita _____	120

Figure 30 : Effet dose sur la survie <i>in vitro</i> et sous forme fixée de <i>M. bovis</i> Oger2 en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ).	122
Figure 31 : Effet dose sur la survie <i>in vitro</i> et sous forme fixée de Mmm Rita en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ).	123
Figure 32: Effet dose sur la survie <i>in vitro</i> de <i>M. bovis</i> Oger2 N8 (a) et de Mmm Rita N6 (b) en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ).	126
Figure 33 : Observation par microscopie confocale de macrophages bovins infectés ou non avec <i>M. bovis</i> Oger2 N8 à des MOI de 5, 50 et 500 en cinétique de 4h et 24h post infection.	132
Figure 34 : Observation par microscopie confocale de macrophages bovins infectés ou non avec <i>M. bovis</i> Oger2 N8 à des MOI de 5, 50 et 500 en cinétique de 48h et 72h post infection.	133
Figure 35 : Microscopie confocale montrant les mycoplasmes <i>M. bovis</i> Oger2 N8 sur le support de culture en présence ou absence de macrophages et antibiotique.	134
Figure 36 : Observation par microscopie confocale de macrophages bovins infectés ou non avec Mmm Rita N6 à différentes MOI en cinétique de 4h et 24h post infection.	138
Figure 37 : Observation par microscopie confocale de macrophages infectés ou non avec Mmm souche Rita N6 à différentes MOI en cinétique de 48h à 72h post infection. La condition à 72 heures post infection a été réalisée avec et sans antibiotique (tilmicosine).	139
Figure 38 : Microscopie confocale montrant les mycoplasmes Mmm Rita N6 sur le support de culture en absence ou en présence d'antibiotique et en présence ou absence de macrophages.	140
Figure 39 : Macrophages infectés avec Mmm souche Rita N6 à une MOI de 200 après 72 heures d'infection	140
Figure 40 : Microscopie confocale des cellules EBL infectées durant 2 heures avec des mycoplasmes fluorescents à une MOI de 200.	142
Figure 41 : Structure schématique du virion de la peste des petits ruminants (PPR)	148
Figure 42 : Séquences optimisées de la protéine H du virus de la PPR (Hopt)	153
Figure 43 : obtention des pMT/Hopt et pMT/Hopt-PS-myc	154
Figure 44 : Vérification de la stabilité de l'insertion du gène de la protéine H chez des mutants de Mmc.	156
Figure 45 : Gel d'électrophorèse permettant de vérifier la transcription du gène codant pour la protéine H du virus de la PPR dans nos mutants de Mmc.	158

Liste des tableaux

<i>Table 1 : Remaniements de la taxonomie du groupe mycoides.</i>	<i>27</i>
<i>Table 2: Tableau synthétique des principaux mycoplasmes affectant les ruminants ainsi que leurs maladies associées.</i>	<i>38</i>
<i>Table 3 : Tableau des séquences des amorces utilisées pour ces travaux de thèse</i>	<i>57</i>
<i>Table 4 : séquences des amorces et adaptateurs utilisés pour la détermination du lieu d'insertion du système pMT/exp.....</i>	<i>60</i>
<i>Table 5 : Séquences des amorces utilisées pour la vérification de l'intégrité des séquences par séquençage de sanger.</i>	<i>63</i>
<i>Table 6 : Caractéristiques physico-chimiques des différentes protéines fluorescentes utilisées au cours de ce travail. Nd : données non déterminées ou non disponibles</i>	<i>93</i>
<i>Table 7: Usage préférentiel des codons chez Mmm. Chaque acide aminé correspond la séquence nucléotidique du codon le plus fréquemment utilisé par la souche type PG1.</i>	<i>94</i>
<i>Table 8 : Séquences optimisées selon l'usage préférentiel de codons de Mmm pour GFP2opt, mCherryopt, mKO2opt et mNeonGreenopt.</i>	<i>95</i>
<i>Table 9 : Comparaison des médianes d'intensité de fluorescence (MFI) des différents clones fluorescents exprimant la GFP2 (GX) chez les mutants de Mmm et la mNeonGreen (NX) chez les mutants de Mmm et M. bovis par rapport au souches sauvages.</i>	<i>101</i>
<i>Table 10 : Comparaison des intensités de fluorescence entre les clones N6 (Mmm) et N8 (M. bovis) et leur souches sauvages respectives.....</i>	<i>104</i>
<i>Table 11 : Sites d'insertion du transposon dans les différentes souches mutantes fluorescentes chez Mmm et M. bovis.....</i>	<i>106</i>
<i>Table 12 : Quantification des mycoplasmes cultivés seuls au cours du temps avec ou sans lavages avant titrage.</i>	<i>124</i>
<i>Table 13 : Détermination de la dose bactéricide de gentamicine pour M. bovis Oger2et Mmm Rita en milieu PPLO.....</i>	<i>128</i>
<i>Table 14: Effet des antibiotiques sur les mycoplasmes seuls dans les conditions de culture cellulaire.</i>	<i>129</i>

Liste des annexes

<i>Annexe 1 : Séquestre pulmonaire. Dans les cas chroniques de PPCB, les lésions pulmonaires évoluent vers la formation de « séquestres » (flèche noire). (crédits photographiques : François Thiaucourt).....</i>	<i>182</i>
<i>Annexe 2 : Composition du milieu Luria-Bertani, LB</i>	<i>182</i>
<i>Annexe 3 : Composition du supplément à ajouter au milieu de base PPLO pour la culture des mycoplasmes ...</i>	<i>182</i>
<i>Annexe 4 : Alignements des séquences des promoteurs des gènes tufA chez différents membres du groupe mycoides</i>	<i>182</i>
<i>Annexe 5 : Analyse quantitative de la présence de mycoplasmes vivants au cours du temps en présence de macrophages bovins.</i>	<i>183</i>
<i>Annexe 6 : Effet dose sur la survie in vitro et sous forme fixée de M. bovis Oger2 (a, rose) et Mmm Rita (b, vert) en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ).</i>	<i>183</i>
<i>Annexe 7 : Effet dose sur la survie in vitro de M. bovis Oger2 N8 (a, rose) et Mmm Rita N6 (b, vert) en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ).</i>	<i>184</i>
<i>Annexe 8 : contrôle de l'adhérence des mycoplasmes M. bovis aux lamelles de verre par rapport aux cellules EBL.</i>	<i>184</i>
<i>Annexe 9 : Alignement des séquences protéiques des peptides signaux de la H-PPRV et de celui de la prolipoprotéine de Mmm.</i>	<i>185</i>
<i>Annexe 10 : Alignements des séquences protéiques des peptides signaux de différentes lipoprotéines de Mmm</i>	<i>185</i>

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) et la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) sont des maladies à déclaration obligatoire qui figurent dans la liste de l'office international des épizooties (OIE). En effet, ces maladies exotiques représentent un risque économique important dans les pays en développement où une grande partie de la population dépend de l'élevage. Le CIRAD est laboratoire de référence OIE pour la PPCB et la PPCC. Il dépend des ministères de la recherche et des affaires étrangères et s'occupe principalement de projets collaboratifs avec de nombreux pays dans le monde où ces maladies sont encore présentes, notamment en Afrique.

Ce projet de thèse est financé par le CIRAD afin de renforcer les connaissances sur la PPCB, et les mycoplasmoses en général ainsi que d'améliorer leur contrôle. Ce projet de thèse est réalisé au sein de l'unité ASTRE qui a pour principaux objectifs l'amélioration de la santé animale, la santé publique et la sécurité alimentaire au Sud, notamment dans le cadre des changements globaux et des transitions des socio-écosystèmes. Le choix d'un sujet portant sur l'expression de gènes hétérologues par des mycoplasmes a été réalisé afin de répondre à deux objectifs principaux. Le premier était de mettre au point des mycoplasmes marqués avec des protéines fluorescentes, afin de suivre l'interaction entre *Mmm* et différents types cellulaires de l'hôte. Le second était de faire exprimer des protéines virales de la peste des petits ruminants (PPR) aux mycoplasmes pour le développement de la preuve de concept des mycoplasmes comme vecteurs vaccinaux. La réalisation de ce projet se justifie par le fait qu'il n'existe que très peu de données sur les interactions entre ces mycoplasmes et les cellules de l'hôte. De plus, l'expression de protéines virales par les mycoplasmes ainsi qu'une meilleure connaissance des interactions hôte/pathogène pourraient laisser entrevoir le développement de produits avec des applications vaccinales. Cela est important pour le CIRAD dont l'un des objectifs principaux est de réaliser des recherches appliquées.

1

La classe des *Mollicutes* et les mycoplasmoses des ruminants

I.1. Description générale de la classe des *Mollicutes*

Les *Mollicutes* constituent un large groupe de bactéries, certaines représentant la plus petite unité procaryote capable de réplication autonome en milieu axénique connue à ce jour (Fraser et al., 1995). Les *Mollicutes* ont évolué de manière réductive à partir d'un ancêtre commun avec les bactéries à Gram positif de type *Bacillus* et *Clostridium* (Woese, 1987). En effet, au cours de cette évolution il y a eu une perte massive de gènes (Glass et al., 2006), mais aussi l'acquisition d'autres gènes par transfert horizontal (Sirand-Pugnet et al., 2007). Durant leurs processus évolutifs les *Mollicutes* ont perdu une proportion considérable de matériel génétique de leur ancêtre mais ont conservé les gènes essentiels à leur survie. La compaction significative du génome des *Mollicutes* s'est accompagnée de l'adoption d'un mode de vie souvent parasitaire. De ce fait, les *Mollicutes* sont des parasites obligatoires ou saprophytes capables de coloniser un large spectre d'hôtes tels que les plantes (le plus souvent *via* des arthropodes vecteurs) et les animaux, y compris les humains. La majorité des *Mollicutes* sont des bactéries qui font partie de la flore commensale ou des pathogènes bénins entraînant des infections modérées et chroniques mais rarement mortelles. L'évolution des *Mollicutes* est donc bien corrélée au mode de vie parasitaire de ces bactéries. Les *Mollicutes* disposent d'un nombre de voies métaboliques réduit et ont notamment perdu la capacité à synthétiser le peptidoglycane. Ainsi, ils sont dépourvus de paroi cellulaire. Le terme *Mollicute* reflète en effet l'absence de paroi rigide et signifie en latin « peau molle » : de *molli* (mou, doux) et *cutis* (peau). Leur aspect pléomorphe est d'ailleurs la conséquence de cette absence de paroi (**Figure 1**). L'absence de paroi n'est pas

le seul critère morphologique qui différencie les *Mollicutes* des autres bactéries. En effet, les membres de cette classe sont de très petite taille si on les compare par exemple à *Escherichia coli* (*E. coli*) : 0,15 à 0,8 μm de diamètre, contre 2 μm de long sur 0,8 μm de diamètre pour *E. coli*. Ensuite, leur génome possède aussi une taille réduite par rapport à *E. coli* (0,58 Mpb pour *Mycoplasma genitalium* à 2,2 Mpb pour *Spiroplasma ixodetis* contre 4,6 Mpb pour *E. coli*) avec un faible taux de G+C (23 à 40% contre 50% pour *E. coli*). De plus, le code génétique chez la majorité des *Mollicutes* diffère du code génétique universel car ils utilisent pour la plupart le codon UGA en tant que codon tryptophane (Blanchard, 1990). Les *Acholeplasmes* et les *Phytoplasmes* font exception à cette règle et l'utilisent en tant que codon stop, tel que décrit dans le code génétique universel.

Au niveau métabolique les *Mollicutes* se distinguent des autres bactéries par leur incapacité à synthétiser leurs acides gras, acides aminés, précurseurs d'acides nucléiques ou encore certaines vitamines et autres co-enzymes. De plus, ils sont majoritairement dépendants d'un approvisionnement exogène en stérols nécessaires à leur architecture membranaire, à l'exception des *Phytoplasmes* et des *Acholéplasmes*.

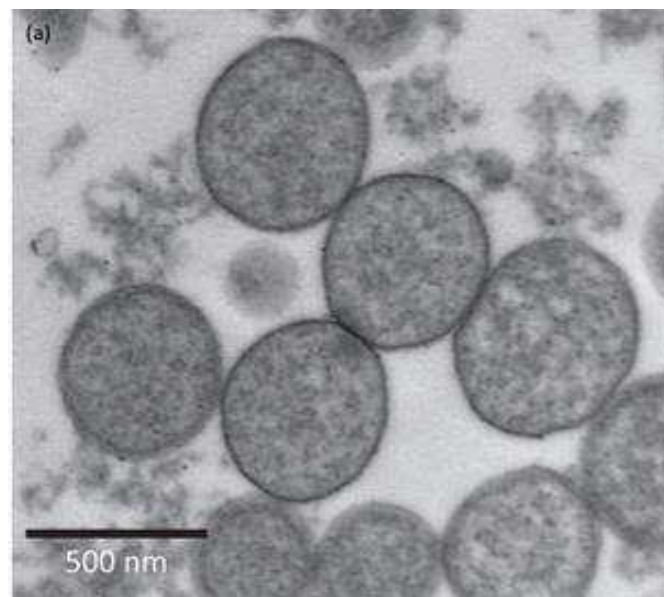


Figure 1 : Microscopie électronique à transmission de cellules mycoplasmiques. Les mycoplasmes (*Mycoplasma agalactiae* sur cette illustration) présentent un aspect pléomorphe dû à l'absence de paroi rigide à peptidoglycane. (d'après Citti and Blanchard, 2013).

Tous les *Mollicutes* ne sont pas cultivables *in vitro* et pour ceux qui le sont, la plupart sont des bactéries anaérobies facultatives. Leur croissance en condition de laboratoire est lente comparée aux autres bactéries, avec un temps de génération de 1 à 6 heures à l'exception de l'espèce *M. feriruminatoris* dont le temps de génération est inférieur à 30 minutes (Fischer et al., 2013). Des milieux de composition riche et complexe sont nécessaires pour permettre leur croissance et développement *in vitro* (milieux avec extraits de levure fraîche, sérum, cholestérol, de l'ADN bactérien, glucose...). Lorsqu'ils sont cultivés sur gélose les *Mollicutes* forment des colonies reconnaissables dites en « œuf sur le plat » (**Figure 2**). Les colonies ainsi formées en surface de la gélose sont de petite taille et possèdent une zone centrale opaque, enfoncée « en clou » dans la gélose ainsi qu'une zone périphérique plus claire (Razin and Oliver, 1961). Les sources d'énergie utilisées par les *Mollicutes* diffèrent selon les espèces. Par exemple, *M. pneumoniae* utilise le glucose, *M. hominis* l'arginine et *Ureaplasma urealyticum* l'urée.

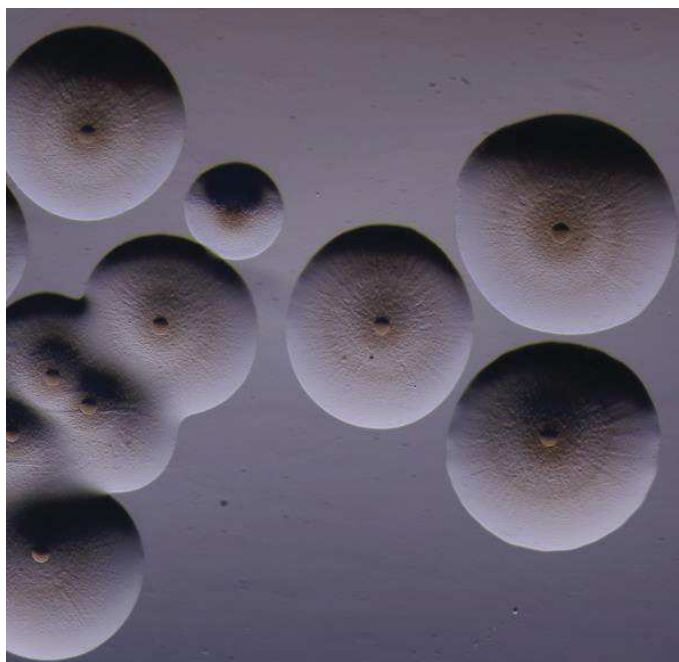


Figure 2 : Observation de colonies de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* cultivées en milieu gélosé. L'éclairage latéral rasant permet de bien distinguer la surface plus ou moins lisse de la colonie, ainsi que sa partie centrale plus foncée, s'enfonçant dans la gélose. (Crédits photo : Tiffany Bonnefois).

L'agent de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) fut le premier *Mollicute* à être cultivé en milieu axénique il y a presque 120 ans (ER Nocard et al., 1898). Le premier nom de cet organisme : *Asterococcus mycoides* fut proposée sur la base d'observations microscopiques. En effet, les observations des microorganismes en culture suggéraient un grand polymorphisme ainsi que des filaments pseudo-mycéliens et une forme astéroïde selon le temps d'incubation (Borrel et al., 1910). A l'époque, ils expliquaient le polymorphisme de ces microorganismes par une possible métamorphose au cours du temps. Aujourd'hui, on peut penser à une probable contamination des cultures. Dans les années qui suivirent sa découverte, plusieurs noms ont été proposés pour cet organisme en fonction des dernières avancées pour être finalement, 58 ans après son premier isolement définitivement identifié et nommé *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* (*Mmm*) (Edward and Freundt, 1956). Cet organisme, et d'autres similaires nommés à cette période « PleuroPneumonia-Like Organisms » (PPLO), ont été initialement catégorisés en tant qu'« ultravirus » en raison de leur petite taille. En effet, ils étaient capables de passer au travers des filtres utilisés à l'époque, arrêtant les bactéries classiques. Mais ces organismes furent finalement assimilés à des bactéries parce qu'ils avaient une activité métabolique propre et pouvaient être cultivés sur des milieux acellulaires. C'est en 1967 que cette classe de bactéries a été officiellement nommée *Mollicutes* par le comité international de bactériologie (Edward and Freundt, 1967). La souche type de *Mmm*, PG1, est par son histoire aussi souche type pour le genre *Mycoplasma* et pour toute la classe des *Mollicutes*. *Mycoplasma* étant le genre le plus répandu de cette classe, le terme « mycoplasme » est utilisé trivialement pour désigner l'ensemble des organismes appartenant cette classe. Ce terme sera utilisé par la suite comme synonyme de *Mollicutes*. La classe des *Mollicutes* comporte quatre ordres (**Figure 3**, colonne de droite) : 1) *Mycoplasmatales*, 2) *Entomoplasmatales*, 3) *Acholeplasmatales* et 4) *Anaeroplasmatales*. L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend une seule famille, celle des *Mycoplasmataceae*. Cette famille, qui est caractérisée par son exigence en stérols, est constituée de deux genres : *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Le genre *Mycoplasma* comprend 107 espèces et sous-espèces à ce jour (Brown, 2010).

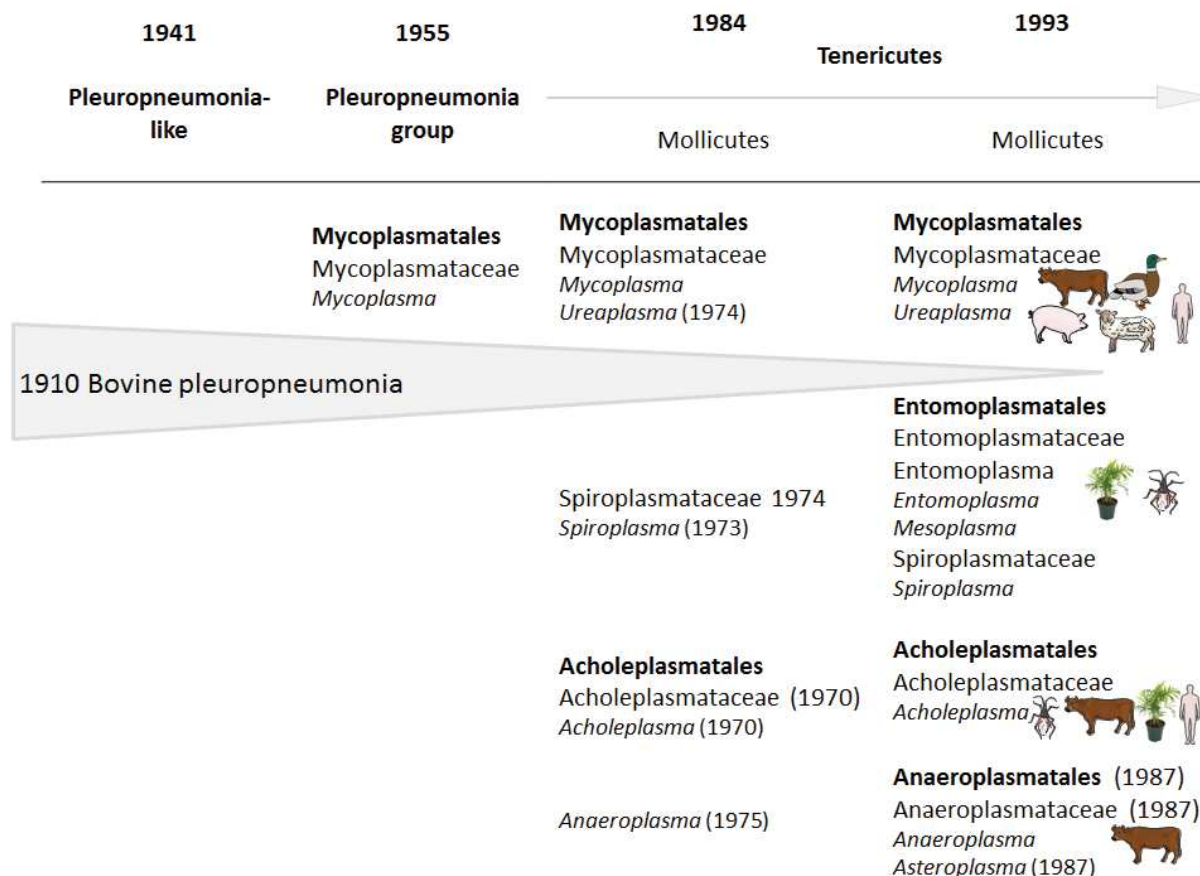


Figure 3: Historique de la découverte des mycoplasmes : Des « bactéries virus-like » au genre *Mycoplasma* (adapté de Brown and Bradbury, 2014).

L'histoire évolutive des *Mollicutes* et les relations entre les différentes espèces ont été décrites grâce à la phylogénie moléculaire. Celle-ci se base sur l'analyse du polymorphisme de séquences de gènes universellement conservés chez les organismes vivants. La construction d'un arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de quatre gènes de ménage a permis d'observer les liens phylogéniques entre les mycoplasmes (Thompson et al., 2011). L'analyse des arbres phylogénétiques a permis de diviser les mycoplasmes en 4 groupes phylogénétiques : Hominis, Spiroplasma, Pneumoniae et le groupe Phytoplasma / Acholeplasma (**Figure 4** d'après Weisburg *et al.*, 1989). Cette figure met aussi en évidence le manque de corrélation entre taxonomie et phylogénie chez les *Mollicutes*. La taxonomie actuelle est donc largement controversée par la communauté scientifique.

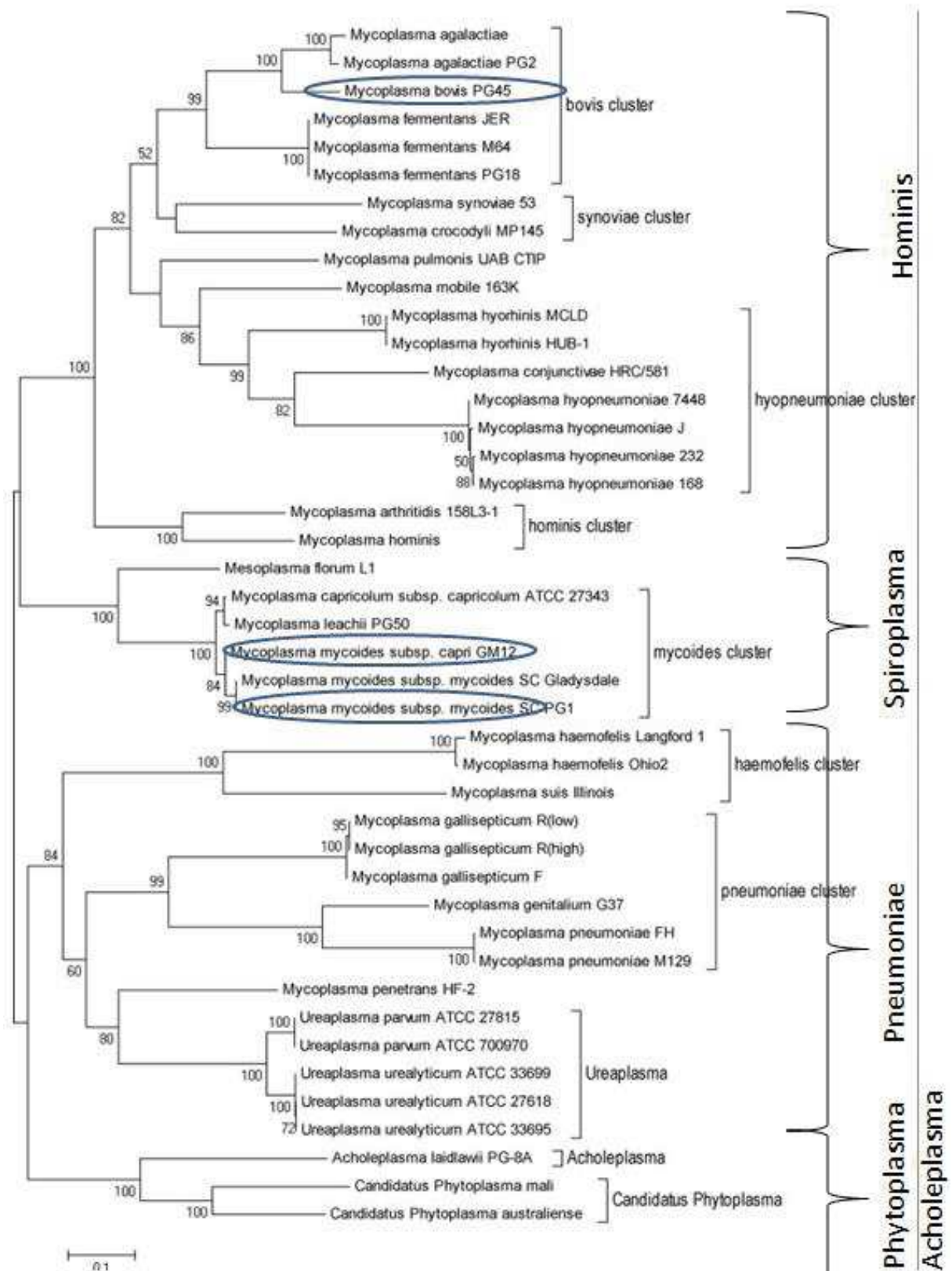


Figure 4 : Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes basé sur les séquences des gènes *adh*, *efp*, *gmk* et *gyrB* établi selon l'estimation du maximum de vraisemblances. (Adapté de Thompson et al., 2011). Sont entourés en bleu les espèces de mycoplasmes utilisés durant ces travaux de thèse.

I.2. Présentation du groupe mycoides

Le groupe *mycoides* appartient au genre *Mycoplasma* et au groupe phylogénétique *Spiroplasma* et se compose de cinq membres (Manso-Silván et al., 2009), tous pathogènes des ruminants : *Mmm*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) et *Mycoplasma leachii* (*M. leachii*).

Quatre autres espèces de mycoplasmes de ruminants sont assez proches phylogénétiquement des membres du groupe *mycoides* : *M. feriruminatoris*, *M. putrefaciens*, *M. cottewii* et *M. yeatsii* (Fischer et al., 2013; Jores et al., 2013; Manso-Silván et al., 2007).

- Identification et évolution de la classification

Les nombreuses similitudes sur les plans génétiques, biochimiques ou encore antigéniques des différents membres du groupe *mycoides* rendent leur classification et leur identification compliquée (Pettersson et al., 1996; Weisburg et al., 1989). Bien que très proches entre eux, ces mycoplasmes, entraînent des maladies bien distinctes et avec des impacts économiques et législatifs différents d'où la nécessité de différencier précisément ces agents.

En 1987 le groupe *mycoides* était divisé en six taxons (**Table 1**) : *Mmm* biotype Small Colony (*MmmSC*), *Mmm* biotype Large Colony (*MmmLC*), *Mmc*, *Mcc*, les souches « type F38 » et les mycoplasmes pathogènes bovins du groupe 7 de Leach (MBG7) (Cottew, et al., 1987). Cette classification avait été faite avant l'arrivée des techniques de phylogénie moléculaire et elle était essentiellement basée sur les tests d'inhibition de croissance complétés par des tests biochimiques ou encore des caractéristiques de croissance (Cottew et al., 1987).

Table 1 : Remaniements de la taxonomie du groupe mycoides.

« Groupe Mycoides »						
	Sous groupe mycoides			Sous groupe capricolum		
Taxonomie de 1987 ^a	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	<i>Mycoplasma</i> sp. Groupe7	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	<i>Mycoplasma</i> sp. F38 like
Taxonomie actuelle ^b	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>		<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	<i>Mycoplasma leachii</i>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>

^a d'après Cottew et al. 1987 (Cottew, et al., 1987)

^b d'après Manso-Silvan et al. (Manso-Silvan, et al., 2007, Manso-Silvan, et al., 2009)

Lors de la réalisation de tests d'inhibition de croissance, des réactions croisées étaient souvent observées, notamment entre *MmmSC* (agent de la PPCB) et *MmmLC*. Mais leur différences en terme de taille de colonies, résistance à la chaleur (45°C) et capacité à digérer le sérum coagulé a quand même permis de faire la distinction entre ces deux biotypes (Cottew and Yeats, 1978).

L'agent responsable de la PPCC, connu pendant des années comme « souches F38-like » en référence à la souche type F38, fut finalement nommé *Mccp* en 1993 (Bonnet et al., 1993). En effet, les analyses effectuées par hybridation d'ADN ont montré une importante homologie avec *Mcc* et ont influencé son assignation en tant que sous-espèce de *Mycoplasma capricolum*, tel que suggéré auparavant par des données génomiques et phénotypiques (Manso-Silván et al., 2009). De nouveaux tests d'identification plus rapides et basés soit sur la reconnaissance immunologique par « membrane filtration dot blot » (Poumarat et al., 1992) soit sur l'amplification de séquences spécifiques par PCR (Le Grand et al., 2004) ont vu le jour dans les années 90.

L'identification et la classification au sein de ce groupe étaient très compliquées. En effet, certains taxons, tels que *MmmSC* et les souches F38-like étaient extrêmement homogènes, alors que d'autres tels que *MmmLC*, *Mmc*, *Mcc* et MBG7, pas du tout. Les difficultés rencontrées pour leur classification étaient aussi dues à la variabilité importante dans la composition de leurs antigènes de surface au sein d'une population clonale alors

que, paradoxalement, on retrouvait de grandes similarités antigéniques entre les différents taxons qui étaient responsables des réactions croisées (Le Grand et al., 2004; Tardy et al., 2009).

Récemment, et grâce aux nouvelles techniques moléculaires, une nouvelle classification a été établie. En effet, les résultats des analyses menées sur les ADNr 16S et sur la séquence d'une protéine membranaire putative du groupe mycoides ont permis de rassembler *Mmm*LC et *Mmc* en une seule entité (Pettersson et al., 1996; Thiaucourt et al., 2000a). Ces premiers résultats, ont ensuite été confirmés par la phylogénie basée sur cinq gènes de ménage concaténés (Manso-Silván et al., 2007) (**Figure 5**), et ont ensuite abouti à la réunification de *Mmc* et *Mmm*LC en une seule sous-espèce, *capri*. Cette sous-espèce est alors divisée en deux serovars : « LC » et « capri » (Manso-Silván et al., 2009). Ces analyses ont renforcé les données de phylogénie plus anciennes qui montraient une importante proximité entre MBG7, *Mccp* et *Mcc* (Manso-Silván et al., 2007). Les analyses antérieures définissait MBG7 en tant qu'espèce génétiquement chimère à l'interface des espèces *mycoides* et *capricolum* (Manso-Silván et al., 2009; Tardy et al., 2009). Suite aux dernières analyses, MBG7 a été nommé *M. leachii* avec un statut d'espèce à part entière (Manso-Silván et al., 2009).

Pour finir, des analyses de datation moléculaire ont été réalisées en utilisant des approches Bayésiennes pour l'ensemble du groupe mycoides. Ces analyses ont permis d'évaluer l'apparition de l'ancêtre commun du groupe à environ 10 000 ans (Fischer et al., 2012).

Avec l'utilisation d'une approche similaire il a été possible de dater l'apparition de l'ancêtre commun à l'ensemble des souches de *Mmm*. Cet ancêtre commun serait apparu vers 1700. Par ailleurs, l'ancêtre des souches qui circulent en Afrique serait apparu, vers 1800. A cette époque la PPCB était bien connue et présente en Europe ce qui permet de penser que l'introduction de la PPCB en Afrique Sub-saharienne a eu lieu au moment de la colonisation (Dupuy et al., 2012). L'histoire évolutive de la PPCC a aussi été investiguée par cette approche et la date d'apparition de l'ancêtre commun à toutes les souches de *Mccp* a été estimée vers 1740 (Dupuy et al., 2015). Les dates d'apparition des ancêtres communs des souches de *Mmm* et *Mccp* sont assez proches alors que leurs vitesses d'évolution

respectives diffèrent ($1.3 \cdot 10^{-6}$ substitutions par site et par an pour *Mccp* par rapport à $5 \cdot 10^{-7}$ pour *Mmm*).

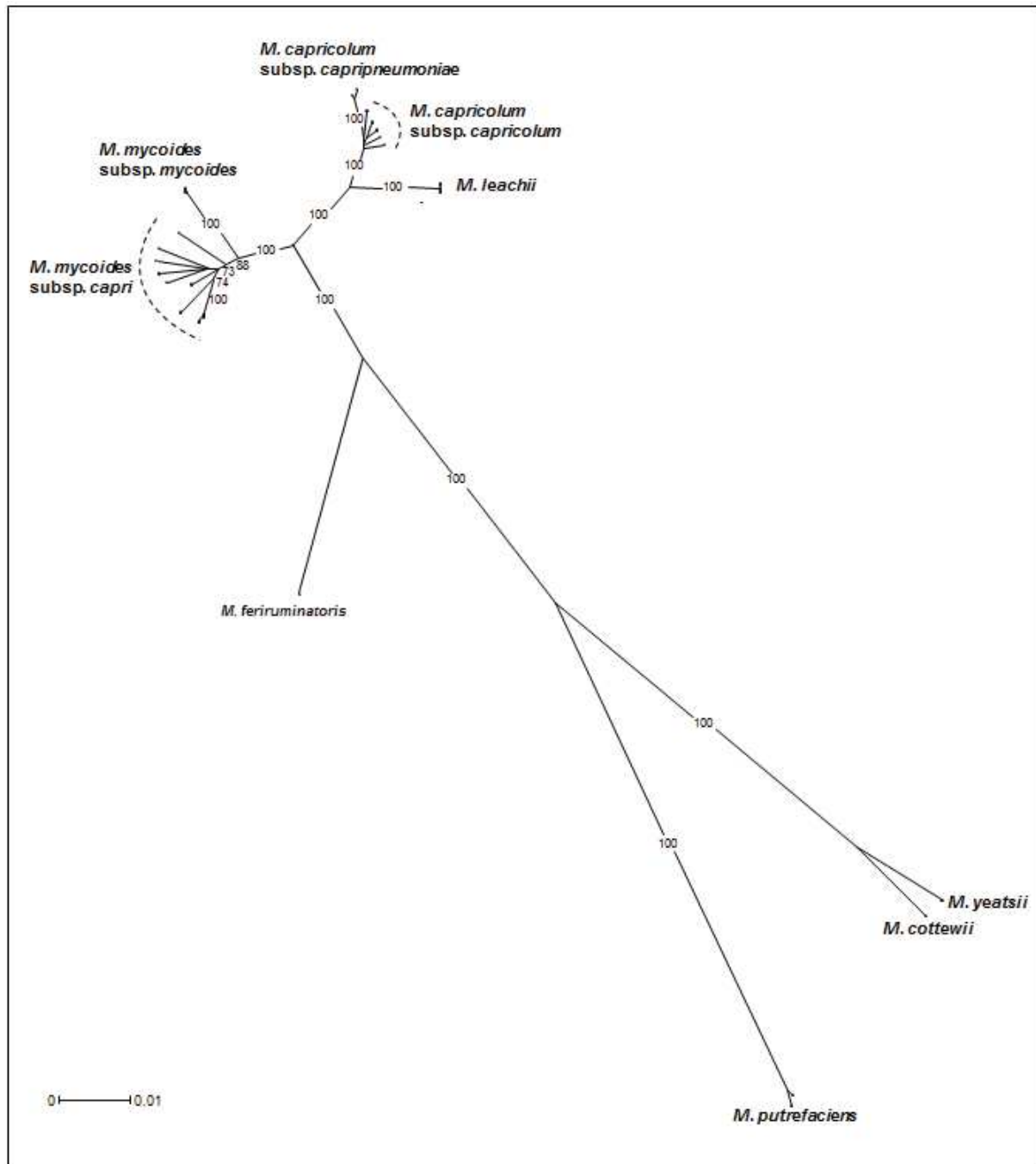


Figure 5 : Arbre phylogénétique du groupe mycoides réalisé par la méthode du plus proche voisin avec les séquences concaténées de cinq gènes de ménage. (crédit Lucia Manso-Silvan).

I.3. Le groupe Hominis (focus sur *Mycoplasma bovis*)

Le groupe phylogénétique Hominis, dont *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) fait partie, est très éloigné phylogénétiquement du groupe mycoides. Nous avons choisi d'utiliser un mycoplasme de ce groupe au cours de cette thèse pour évaluer la versatilité des outils développés initialement pour une utilisation chez le groupe mycoides mais qui pourrait être utilisé plus largement chez les *Mollicutes*. A l'opposé du groupe mycoides, qui ne comporte que des pathogènes de ruminants, le spectre d'hôte du groupe hominis est très large. En effet, il comprend en plus des pathogènes des ruminants, des pathogènes humains, des rongeurs, des reptiles etc. Les pathogènes des ruminants de ce groupe sont au nombre de trois : *M. conjunctivae*, *M. agalactiae* (pathogène des ovins et caprins) et *M. bovis* (pathogène bovin). *M. agalactiae* et *M. bovis* présentent plus de 99,8% de similitude entre leurs séquences d'ARNr 16S (Pettersson et al, 1996) et avaient été groupés pour cette raison dans une seule espèce. Ils sont considérés comme espèces à part entière depuis 1976 (Askaa and Ernø, 1976). Leurs caractéristiques morphologiques et culturelles sont identiques à celles des autres *Mollicutes*, décrites dans la partie précédente, avec une caractéristique particulière pour les cultures solides. En effet la saponification du milieu après quelques jours entraine la précipitation de stérols et cette réaction est visible par la formation de « films and spots ».

M. bovis est un des mycoplasmes de ruminants les plus étudiés car il a une répartition mondiale et est impliqué dans plusieurs affections avec des conséquences économiques importantes (Maunsell et al., 2011). Il est à l'origine d'une pathogénie bien distincte de celle de la PPCB et des études d'adhésion, invasion et persistance de ce mycoplasme dans différents types cellulaires ont déjà été décrits dans la littérature (Bürki et al., 2015a). Cette espèce a donc été utilisée aussi dans ces travaux de thèse pour effectuer des études fonctionnelles comparatives avec notre modèle *Mmm*.

La première souche de *M. bovis* entièrement séquencée en 2011 fut la souche type PG45^T, isolée en 1961 à partir d'un cas de mammite bovine par Hale et al aux Etats-Unis (Hale et al., 1962). Son génome comprend 1003,4 kpb avec 766 gènes, 61 pseudo-gènes et 29,3% de teneur en G+C (Wise et al., 2011).

I.4. Facteurs de virulence des membres du groupe mycoides (modèle *Mmm*)

La pathogénie de la majeure partie des mycoplasmoses est le plus souvent due à une exacerbation des réponses immunitaires de l'hôte vis-à-vis du pathogène. Chez les mycoplasmes cultivables les facteurs de virulence peuvent être définis comme ceux qui ne sont pas essentiels à leur culture *in vitro* mais indispensables *in vivo* (Browning et al., 2014). La pathogénie des membres du groupe mycoides n'est pas encore bien appréhendée mais ces maladies sont caractérisées par une réaction inflammatoire importante qui peut être induite directement ou non par les mycoplasmes ou leurs dérivés toxiques. Les études sur ce groupe ont été réalisées en majorité chez *Mmm*. Aucun gène apparenté aux facteurs de virulence classiquement décrits chez les autres bactéries n'a été identifié dans son génome. En effet, il ne contient pas les traditionnelles adhésines, toxines et invasines (Westberg et al., 2004). Plusieurs autres facteurs pourraient participer au pouvoir pathogène de *Mmm*, tel que la sécrétion de métabolites secondaires oxydants, certaines protéines de surface ou encore la production de polysaccharides capsulaires (CPS) et d'exopolysaccharides (EPS) (Pilo et al., 2007).

- **I.4.1.** La sécrétion d' H_2O_2

Le mécanisme de pathogénicité le mieux décrit chez le groupe mycoides est lié au métabolisme du glycérol. En effet la sécrétion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) chez *Mmm*, dérivée du métabolisme du glycérol, a été démontrée comme responsable de toxicité cellulaire *in vitro*. Cette sécrétion pourrait potentiellement *in vivo*, entraîner la stimulation d'un phénomène inflammatoire (Pilo et al., 2005). Ces résultats amènent à considérer la glycérol-phosphate oxydase membranaire (GlpO) comme potentiel facteur de virulence de *Mmm* (Pilo et al., 2007). Cette enzyme catalyse la désoxydation du glycérol-3-phosphate en dihydroxyacetone phosphate entraînant le relargage de H_2O_2 , qui induit par la suite l'inflammation et les lésions cellulaires chez l'hôte (**figure 6**). Pour que la cytotoxicité ait lieu il faut une interaction très étroite entre le mycoplasme produisant l' H_2O_2 et la cellule hôte. Ce facteur de virulence à lui seul n'explique pas la pathogénicité. En effet, la souche vaccinale T1/44, dont la virulence est fortement atténuée, produit également de l' H_2O_2 et les

résultats des tests de cytotoxicité ne diffèrent pas significativement de ceux des souches africaines hautement pathogènes (Bischof et al., 2008). De plus, sa capacité d'adhérence est tout à fait équivalente à celle des souches virulentes (Aye et al, 2015).

La protection induite par un vaccin contenant cette protéine sous forme recombinante, en émulsion dans de l'adjuvant de Freund, a été investiguée (Mulongo et al., 2013). Une importante réponse anticorps anti-GlpO a été obtenue mais cependant aucune protection n'a été observée lors du test d'épreuve. Au contraire, les bovins immunisés ont présenté des signes cliniques plus importants que ceux observés sur le lot contrôle.

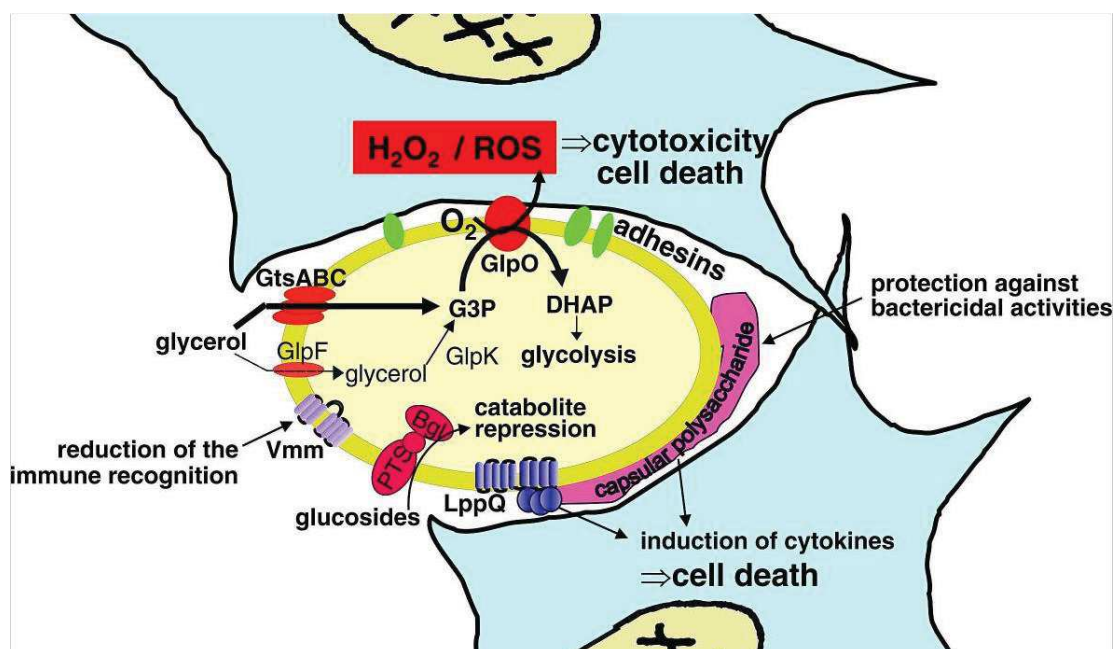


Figure 6 : Représentation schématique des potentiels mécanismes de virulence de *Mmm*. (D'après Pilo et al., 2007)

- **I.4.2. Les lipoprotéines**

Chez les *Mollicutes*, les protéines membranaires sont pour la majorité d'entre-elles des lipoprotéines. Ces dernières ont un haut pouvoir antigénique et sont soupçonnées de déclencher le processus inflammatoire en modulant l'adhésion et en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires de l'hôte (Belloy et al., 2003; Brenner et al., 1997; Herbelin et al., 1994). Au sein du génome de *Mmm* on retrouve 56 gènes prédits comme codant des lipoprotéines et 86 pour *Mmc*. Chez *Mmc*, les séquences

de ces gènes présentent une grande hétérogénéité d'une souche à une autre alors qu'elles sont très homogènes chez *Mmm* (Thiaucourt et al., 2011).

L'impact sur le système immunitaire des lipoprotéines LppA, LppB, LppC et LppQ, a été évaluée (Dedieu et al., 2010). Seule la lipoprotéine immunodominante LppQ semble spécifique de *Mmm* (Pilo et al., 2003, 2007; Vilei et al., 2000) et a servi de base à l'élaboration d'un test de sérodiagnostic par ELISA (Abdo et al., 2000; Bruderer et al., 2002). L'élaboration d'un vaccin avec cette protéine n'a pas mis en évidence d'effet protecteur mais, *a contrario*, induirait une exacerbation des signes de la PPCB (Mulongo et al., 2015).

En définitive, peu d'études à ce jour rendent compte de la virulence potentielle des lipoprotéines chez *Mmm*.

- **I.4.3. Les variations antigéniques**

En absence de paroi cellulaire, les mycoplasmes ont développé des mécanismes élaborés et complexes offrant un dynamisme architectural adaptatif de leur membrane plasmique. Le rôle des protéines membranaires variables à la surface des mycoplasmes est très largement étudié pour mieux comprendre leur persistance et leur capacité à contourner ou échapper au système immunitaire. Ces protéines membranaires sont soumises à des oscillations de phase ON/OFF et/ou des variations de taille aléatoires à très haute fréquence (Citti et al., 2010). Ces mécanismes d'oscillations, en modulant rapidement la diversité antigénique membranaire, modulent les interactions avec leur cellules hôte, contribuent à l'échappement au système immunitaire et au maintien des populations mycoplasmaïques dans l'organisme (Citti et al., 1997, 2010; Denison et al., 2005; Sachse et al., 2000). Certaines de ces protéines interviennent également dans l'adhésion ou le transport membranaire (Sachse et al., 2000; Theiss and Wise, 1997). Les mécanismes génétiques à l'origine de ces oscillations sont variés et décrits avec précision dans plusieurs revues (Citti and Rosengarten, 1997; Citti et al., 2010). Contrairement à d'autres mycoplasmes pathogènes de ruminants tels que *M. bovis* ou *M. agalactiae*, ces mécanismes semblent beaucoup moins généralisés chez *Mmm* pour lequel seulement deux types de variations sont décrits.

Un premier mécanisme concerne une famille de protéines variables de surface nommées Vmm qui entraînent une réponse humorale chez l'hôte (Hamsten et al., 2008).

Leur variation est régulée au moment de la transcription par ajout ou délétion de nucléotides impactant sur la taille finale de la protéine (Persson et al., 2002). Ces variations réversibles de taille interviennent à une fréquence de 9×10^{-4} to 5×10^{-5} par cellule et par génération. Néanmoins ces protéines ne sont pas immunodominantes et leur rôle dans la pathogénèse de la PPCB n'est à ce jour pas élucidé. Des gènes analogues de ceux codant les Vmm ont été identifiés chez les autres membres du groupe mycoides et *M. putrefaciens* (Persson et al., 2002). L'expression des produits de ces gènes ainsi que le phénomène de variation de phase est caractérisé pour les Vmc de *Mcc* (Wise et al., 2006) .

Le second mécanisme, découvert lors d'immunodétections sur colonies avec des anticorps monoclonaux, s'adresse à la perméase MSC_0860 appartenant à un système phosphotransférase du glucose (PtsG) (Gaurivaud et al., 2004). La variabilité est de type « switch ON/OFF ». La substitution d'une base en position 622 de la séquence ADN interrompt la traduction, conduisant à l'expression d'une protéine tronquée non-fonctionnelle (non détectée par les anticorps spécifiques) ou de la perméase intègre et fonctionnelle (détectée par les anticorps spécifiques). La protéine PtsG est associée chez *Mmm* à la présence/absence de capsule (Bertin et al., 2013). Cette capsule est composée d'un polysaccharide extracellulaire appelé galactane. Le galactane est un polymère qui peut à la fois faire partie de la capsule (CPS) et être sécrété sous forme libre non associée aux cellules (EPS) (Bertin et al., 2013).

- **I.4.4. Les polysaccharides**

L'implication des polysaccharides dans l'initiation et la persistance de la PPCB a longtemps été envisagée. La production de galactane par *Mmm* a été suspecté d'induire des dommages tissulaires *in vivo* (Buttery et al., 1976) mais il demeure un doute sur la pureté des produits inoculés aux bovins. Ces lésions pourraient s'expliquer par une réaction auto-immune due à la ressemblance antigénique entre le galactane du mycoplasme et celui des poumons. Chez *Mmm* le galactane est aussi probablement impliqué dans la persistance et la dissémination du mycoplasme chez l'hôte en protégeant le mycoplasme du système immunitaire (complément, granules lytiques, anticorps) (Lloyd et al., 1971). En effet, les variants capsulés de *Mmm* induisent chez la souris une bactériémie plus longue *in vivo* que les variants ne produisant pas de capsule et sont plus résistants à l'inactivation par le sérum

in vitro (Gaurivaud et al., 2014). En ce qui concerne les variants non capsulés, qui produisent des polysaccharides sous forme libre (EPS), ils présentent une meilleure capacité d'adhésion aux surfaces et peuvent favoriser la production des biofilms (Garivaud et al., 2014). Ces mutants présentent aussi une plus grande résistance au H₂O₂ et aux peptides antimicrobiens. Cependant, il a été montré plus récemment que les EPS possédaient des propriétés anti inflammatoires. En effet, le galactane purifié à partir de *Mmm* augmente la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 *in vitro* par des macrophages bovins et, réduit la production de cytokines pro inflammatoires induite par le LPS chez ces mêmes cellules (Totté et al., 2015).

Des mutants dépourvus de galactane obtenus chez *Mmc* ont permis d'envisager l'hypothèse que ces sucres masquaient les adhésines mais étaient nécessaires à l'intégrité de la membrane (Schieck et al., 2016). De manière intéressante, ils ont aussi montré que l'absence de galactane augmentait l'adhésion aux cellules et la résistance au sérum.

Pour terminer, il a été montré que *Mmm* est capable de produire des biofilms sur des surfaces inertes, ce qui lui permet de mieux résister aux stress du milieu extérieur (la chaleur et les détergents) mais aussi d'accroître sa persistance (McAuliffe et al., 2008). Ces biofilms sont constitués typiquement de polysaccharides. En effet, comme mentionné précédemment, les variants non capsulés de *Mmm*, qui produisent des EPS, présentent une meilleure capacité adhésion aux surfaces et sont soupçonnées de favoriser la production des biofilms (Garivaud et al., 2014).

I.5 Facteurs de virulence de *M. bovis*

Les mécanismes de pathogénicité de *M. bovis*, récemment révisés par Bürki et ses collaborateurs (Bürki et al., 2015a) sont résumés brièvement dans ce paragraphe. Tout d'abord, comme chez *Mmm*, on retrouve une forte variation antigénique selon les souches (Poumarat et al., 1994). L'hétérogénéité induite par la variation antigénique des souches de *M. bovis* étudiées n'est pas corrélée au lieu de collecte des souches (origine géographique ou organe prélevé). Les variations antigéniques sont plus importantes en présence d'anticorps spécifiques *in vitro* (Le Grand et al., 1996). Ces modifications permettent donc à *M. bovis* d'échapper en partie au système immunitaire et contribuent à la chronicité des affections à *M. bovis*. Les lipoprotéines variables de surface identifiées chez *M. bovis*

appartiennent à la famille des Vsp. Aussi, *M. bovis* est capable de produire de l' H_2O_2 (Schott et al., 2014). Par contre, la GlpO identifiée chez *Mmm* est absente chez *M. bovis*. La production de biofilms par *M. bovis* contribue à leur persistance chez l'hôte (McAuliffe et al., 2006). Cette conformation en biofilm peut augmenter les lésions cellulaires car les phagocytes sont attirés en masse vers le lieu de l'infection sans pouvoir éliminer les mycoplasmes mais en re-larguant des composés toxiques (enzymes, radicaux libres).

2

Réponses immunitaires innées de l'hôte vis-à-vis des mycoplasmes

Les caractéristiques atypiques des mycoplasmes entraînent souvent une réponse immunitaire dérégulée et exacerbée chez l'hôte infecté (Szczepanek and Silbart, 2014). Ceci permet au pathogène d'occuper les tissus associés aux muqueuses et parfois même de se disséminer vers d'autres tissus à distance du site primaire d'infection. L'occupation de ces niches écologiques est en grande partie due à l'absence de paroi cellulaire et à la présence de protéines de surface variables. Les mycoplasmes sont des experts dans la manipulation des mécanismes de défense de l'hôte. En effet ils sont capables de modifier bon nombre de signaux à leur avantage, comme la manipulation de la signalisation du système immunitaire inné (TLRs, cytokines, molécules chimiotactiques). Les lésions observées lors d'infections à mycoplasmes sont caractérisées par une forte inflammation, avec la présence de neutrophiles et macrophages dès le début de l'infection. Par la suite, les lymphocytes remplacent progressivement les cellules de l'immunité innée. Plusieurs études ont montré une altération du chimiotactisme cellulaire *in vitro* par une lipoprotéine mycoplasmaïque (MALP-2) tel que l'inhibition de la migration des neutrophiles vers les tissus infectés (Chin et al., 2009). Certaines lipoprotéines exprimées à la surface des mycoplasmes peuvent interagir avec les cellules épithéliales ciliées et les leucocytes de l'hôte. Les cellules de l'immunité innée sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) *via* leurs récepteurs spécifiques de ces motifs (PRRs), dont les TLRs font partie. Ces

récepteurs sont les premiers à interagir avec les PAMPs et initient la réponse immunitaire innée en déclenchant diverses cascades de signalisation, ainsi qu'une phagocytose directe du pathogène. Une grande partie des motifs reconnus par les TLRs est absente chez les mycoplasmes. En effet, ils sont notamment dépourvus de flagelline, et d'acide lipoteichoïque. L'interaction entre une lipoprotéine mycoplasmaïque et un TLR2 a pour la première fois été mise en évidence chez *M. fermentans* (Takeuchi et al., 2000). Depuis, d'autres interactions entre les TLRs et d'autres lipoprotéines ont été décrites, tels que les dimères TLR2/6 avec les lipoprotéines di-acylatées (Okusawa et al., 2004).

Cet art de la manipulation du système immunitaire de l'hôte permet aux mycoplasmes de développer une relation commensale avec l'hôte dans certain cas, ou une infection chronique insidieuse dans d'autres cas. La résolution de l'infection dépend fortement de la capacité du système immunitaire de l'hôte à développer une réponse humorale et cellulaire de qualité et suffisamment robuste. Ce type de réponses peut prendre plusieurs semaines à se développer, et pendant ce temps les mycoplasmes ont largement le temps et l'opportunité de s'adapter à leur environnement et ainsi renforcer leur ancrage aux tissus colonisés. C'est pour toutes ces raisons que le traitement le plus approprié contre les mycoplasmes serait un vaccin prophylactique, qui permettrait de bloquer la colonisation initiale, de prévenir une réponse inflammatoire exacerbée et les dérèglements de la réponse immunitaire adaptative. Une meilleure connaissance des relations entre les mycoplasmes et leurs cellules hôtes est nécessaire à l'amélioration de ces vaccins.

Les mycoplasmoses des ruminants sont des maladies qui affectent divers organes et sont associées à des signes cliniques très variés. Parmi celles-ci, quatre maladies se distinguent particulièrement pour des raisons réglementaires et/ou de sévérité. Il s'agit de la PPCB, la PPCC, l'agalactie contagieuse (AC) et les nombreux syndromes liés à l'affection à *M. bovis*. Les principales mycoplasmoses des ruminants et leurs maladies associées sont résumées dans la **Table 2** (Nicholas et al., 2008).

Agents	Hôtes	Signes cliniques ou syndromes	Groupes Phylogénétiques
<i>M. bovis</i>	Bovins	Bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE), mammites, arthrites et otites	<i>Hominis</i>
<i>M. agalactiae</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Hominis</i>
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	Petits ruminants	Pleuropneumonie Contagieuse Caprine (PPCC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. putrefaciens</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	Bovins	Péripneumonie Contagieuse Bovine (PPCB)	<i>Spiroplasma</i>

Table 2: Tableau synthétique des principaux mycoplasmes affectant les ruminants ainsi que leurs maladies associées.

La PPCB, la PPCC et l'AC sont des maladies contagieuses à déclaration obligatoire à fort impact économique et sanitaire et, de ce fait, sont inscrites sur la liste de l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale). Par contre, et malgré l'incidence grandissante des affections à *M. bovis*, cette maladie n'a pas été classée parmi les dangers sanitaires importants. Pourtant, le coût des troubles engendrés par ces affections représente une part importante du revenu des exploitations et le traitement devient très problématique en raison de l'émergence récente de souches multi-résistantes dans le monde (Heuvelink et al., 2016; Lysnyansky and Ayling, 2016).

- Principales mycoplasmoses des bovins

Maladies des bovins causées par les membres du groupe mycoides

La **PPCB** est causée exclusivement par *Mmm*. De nos jours la PPCB sévit principalement en Afrique sub-saharienne où elle entraîne de fortes pertes économiques et conduit à la précarisation des populations locales. La PPCB aurait été par le passé limitée à certaines régions d'Europe mais se serait répandue dans le monde entier durant la seconde moitié du XIX^{ème} siècle en lien avec les mouvements d'animaux vivants liés au commerce. En Europe, la PPCB a été éradiquée à la fin du XIX^{ème} siècle par des stratégies d'abattage de masse. Dès les années 1900, l'Europe a été considérée indemne de PPCB, toutefois des résurgences ponctuelles et régulières sont apparues dans les pays du sud de l'Europe (Regalla et al., 1996). Aujourd'hui la PPCB est enzootique et en expansion dans la majorité des pays d'Afrique sub-saharienne. De plus, la situation reste mal évaluée en Asie où les preuves fiables d'éradication sont insuffisantes. La PPCB est aujourd'hui considérée par la FAO (Food and Agriculture Organisation of the United States) comme le plus grand fléau de l'élevage bovin pour l'Afrique à l'exception de l'Afrique du Nord.

La PPCB est une maladie à transmission directe entre animaux malades et animaux sensibles (à travers les gouttelettes infectieuses produites lors de la toux). *Mmm* infecte les animaux appartenant au genre *Bos*, ce qui inclut les troupeaux de bovins, de zébus, de Yaks ainsi que le buffle domestique. Il semble y avoir une variation de la susceptibilité à la maladie selon les individus, les races, les conditions climatiques et les infections annexes. De plus les jeunes animaux semblent moins affectés et présentent moins de lésions (Masiga and Windsor, 1978). *Mmm* a été également isolé sporadiquement dans les poumons et d'autres organes chez des caprins et ovins en Afrique, au Portugal et en Inde sans pour autant que ces animaux n'aient développé la maladie (Brandão, 1995; Srivastava et al., 2000). Les animaux en phase aiguë sont responsables de l'expansion rapide de la maladie et ceux en phase chronique, sont sans doute responsables de la persistance à long terme de la maladie. Les petits ruminants et la faune sauvage ne semblent apparemment pas jouer de rôle dans la dissémination.

Les signes cliniques et pathologiques de la PPCB ne sont pas spécifiques et, même si les lésions sont très caractéristiques, d'autres infections peuvent provoquer des tableaux

lésionnels similaires. Cette maladie possède un tropisme tissulaire stricte, avec des lésions localisées uniquement dans la cavité thoracique et qui consistent en une pleuropneumonie exsudative et une pleurésie fibrineuse. Les symptômes associés à cette maladie sont l'anorexie, la diminution de la production de lait, la fièvre (40°C), une détresse respiratoire, de la toux ainsi que des écoulements nasaux durant la phase aiguë de la maladie. La forme aiguë de la maladie peut entraîner la mort de l'animal, mais aussi la persistance sous une forme chronique chez des individus asymptomatiques. Durant ces phases chroniques les signes cliniques ne sont plus marqués et la maladie devient plus difficile à détecter. Les poumons présentent alors des lésions encapsulées typiques nommées "séquestres" **Annexe 1**. L'apparition de ces formes chroniques est potentiellement favorisée par l'utilisation d'antibiotiques et augmente la difficulté à mettre en place des méthodes de contrôle efficaces et durables (cf partie 4).

La présence de *Mmm* doit donc être impérativement confirmée, surtout dans les cas de réémergence de foyers dans un pays déclaré indemne par l'OIE. Les tests sérologiques prescrits sont les tests de fixation par le complément (CFT) et l'ELISA de compétition. De plus, il existe maintenant plusieurs tests PCR et PCR en temps réel spécifiques détectant exclusivement *Mmm* (Dedieu et al., 1994; Lorenzon et al., 2008), voire la souche vaccinale de type T1 (Lorenzon et al., 2000, 2008).

La mycoplasmose à *M. leachii* est caractérisée par des mammites chez les bovins adultes et des polyarthrites chez les jeunes bovins. Ce pathogène a été isolé dans les poumons des bovins, chez des fœtus bovins avortés et chez les petits ruminants (Hum et al., 2000). Le premier isolement de ce pathogène a été décrit en Australie dans les années 60 (Simmons and Johnston, 1963). Depuis d'autres cas ont été rapportés de façon ponctuelle en Chine notamment (Chang et al., 2011). Par ailleurs, le mode de transmission et l'impact économique de cette maladie restent encore mal documentés (Hum et al., 2000).

Syndromes induits par d'autres membres que le groupe mycoides

La mycoplasmose à *M. bovis* entraîne principalement des pneumonies, des arthrites et des mammites dans l'espèce bovine. Elle est aussi associée à des otites, des kératoconjunctivites, des avortements, des endométrites et des salpingites. Aux Etats-Unis, en Suisse et en Italie, les infections à *M. bovis* sont majoritairement des mammites (Aebi et

al., 2012, 2015; Maunsell et al., 2009; Radaelli et al., 2011). Ces mammites à *M. bovis* sévissent aux Etats-Unis à l'état enzootique dans certains états (états de Californie et de New York). La prévalence de *M. bovis* dans les affections respiratoires en tant qu'agent pathogène primaire est sûrement sous-estimée. *M. bovis* est souvent isolé en association avec d'autres germes du complexe respiratoire bovin (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*...) (Nicholas and Ayling, 2003).

Maladies des petits ruminants

La **PPCC** est une maladie respiratoire entraînant de graves symptômes comparables à la PPCB affectant principalement les caprins mais aussi la faune sauvage (Arif et al., 2007; Yu et al., 2013) .

La maladie a pour la première fois était décrite en Algérie dans les années 1870 (Thomas, 1873). *Mccp*, l'agent responsable de cette maladie, a été identifié en 1976 au Kenya (MacOwan and Minette, 1976). La répartition géographique connue de la PPCC a longtemps été limitée à la corne de l'Afrique, dont le Soudan et l'Ethiopie, mais, depuis, avec l'amélioration des moyens diagnostics, il s'est avéré que sa distribution est beaucoup plus large. En effet *Mccp* a été isolé dans plusieurs pays tels que la Tunisie, la Turquie, la Chine et le Tadjikistan (Hadush et al., 2009; Manso-Silván et al., 2009; Ozdemir et al., 2005; Thiaucourt and Bölske, 1996).

La maladie se transmet uniquement par contact direct entre les animaux infectés et les animaux sensibles. Lors de foyers dans des troupeaux mixtes ovins/caprins, les ovins peuvent être infectés tout en restant sains et leur rôle en tant que potentiel réservoir est à prendre en compte. La présence de la PPCC a été confirmée pour la première fois dans la faune sauvage dans une réserve du Qatar avec des taux significatifs de mortalité et de morbidité (Arif et al., 2007). Depuis, la liste d'espèces sauvages d'ongulés sensibles ne cesse d'augmenter (Dupuy et al., 2015).

La forme aiguë de la maladie est caractérisée par une pleuropneumonie séro-fibrineuse unilatérale accompagnée de sévères effusions pleurales (Thiaucourt and Bölske, 1996). Une forme chronique de la maladie existe, avec une atténuation des signes cliniques, sans pour autant une disparition de ceux-ci. L'identification de l'agent responsable de la PPCC doit être effectuée afin d'éviter la confusion, notamment avec la PPR ou une

pasteurellose. Le diagnostic peut être conduit par des tests sérologiques tels que l'ELISA de compétition ou des tests de fixation du complément (CFT). L'isolement de *Mccp* étant fastidieux, une détection de l'agent par PCR avec des amorces spécifiques de *Mccp* à partir de prélèvements est la méthode recommandée pour la confirmation de l'existence de foyer de PPCC (Woubit et al., 2004).

L'agalactie contagieuse ou le syndrome « MAKEPS » (respectivement : mammites, arthrites, kératoconjunctivites, pneumopathies et septicémies) est un syndrome touchant les caprins et les ovins qui peut être provoqué par quatre agents infectieux différents : *Mmc*, *Mcc*, *M. putrefaciens* (appartenant au groupe mycoides) et *M. agalactiae* (appartenant au groupe *Hominis*, comme *M. bovis*) (Gómez-Martín et al., 2013). Ces mycoplasmoses représentent un réel problème socio-économique, particulièrement dans les régions où ces animaux constituent la principale ressource alimentaire d'origine animale. *M. agalactiae* est à lui seul à l'origine de 80% des cas d'agalaxie chez les brebis (De la Fe et al., 2005).

Mcc et *M. agalactiae* ont aussi été isolés chez des petits ruminants sauvages tels que les ibex ou les chèvres des montagnes (Tardy et al., 2012). L'agalaxie contagieuse est décrite dans le monde entier et est particulièrement importante économiquement sur le pourtour méditerranéen et l'Asie.

Le diagnostic final de la maladie nécessite l'isolement de l'agent causal afin d'identifier l'espèce de mycoplasme. De plus, il n'est pas rare que dans un troupeau ou même au sein d'un même animal, on retrouve plusieurs espèces de mycoplasmes différents. En raison de la multiplicité des agents causals, les méthodes de diagnostic par détection d'anticorps circulants (CFT ou ELISA) ou détection directe par PCR sont plus compliquées à mettre en œuvre. Des PCRs spécifiques existent uniquement pour la détection de *M. agalactiae* (Marenda et al., 2005) et *M. putrefaciens* (Peyraud et al., 2003) mais les agents appartenant au groupe mycoides peuvent être identifiés par séquençage d'un fragment du gène *fusA* (Manso-Silván et al., 2007).

4.1 Vaccination et prévention

La vaccination est un des moyens de lutte contre les mycoplasmoses des ruminants. Toutefois, leur étiologie multiple complique la validation clinique de l'efficacité des vaccins. En effet, les conditions environnementales des essais cliniques ne sont pas toujours maîtrisées. Les essais cliniques sur les troupeaux sont coûteux et peu représentatifs, vu le nombre restreint d'animaux testés.

Une multiplication des essais cliniques est nécessaire pour pouvoir apprécier l'efficacité d'un vaccin *in vivo*. Aux États-Unis, plusieurs vaccins sont commercialisés pour la prévention des infections respiratoires à *M. bovis* (Maunsell et al., 2011). Jusqu'à présent, la vaccination contre *M. bovis* n'a pas montré d'efficacité avérée en conditions non contrôlées, telles que celles rencontrées sur le terrain. La particularité des souches de *M. bovis* complique le développement d'une approche vaccinale optimale. En effet *M. bovis* possède la capacité de modifier la composition et l'architecture de sa membrane (Citti et al., 2005a). Cette variabilité antigénique se caractérise par des modifications rapides, spontanées et réversibles des protéines exposées à la surface du mycoplasme permettant de maintenir en permanence une population phénotypiquement hétérogène. Grâce à ce système, les mycoplasmes arrivent à échapper au système immunitaire de leur hôte. Par conséquent, jusqu'à présent, aucun essai clinique vaccinal contre *M. bovis* n'a été concluant. La raison principale de ces échecs était la non maîtrise des réponses immunitaires des bovins vis-à-vis de cette espèce et des différentes réactions des animaux vis-à-vis des vaccins (Pryslak and Perez-Casal, 2016).

Des vaccins développés contre d'autres mycoplasmoses respiratoires (*M. dispar* (Howard et al., 1987) ont montré une certaine efficacité, avec une expression des signes cliniques plus modérées chez les animaux vaccinés. Par contre les tentatives de vaccination contre les affections mammaires ou articulaires à mycoplasmes sont plus infructueuses (Nicholas and Ayling, 2003).

La méthode actuelle utilisée pour le contrôle de la PPCB en Afrique repose sur une vaccination avec une souche vivante de *Mmm* dont la virulence a été atténuée par passage *in vitro* en laboratoire (T1/44). Bien que conférant un certain degré d'immunité, ce vaccin comporte plusieurs inconvénients tels qu'une efficacité faible (Thiaucourt et al., 2000b) et une faible persistance de l'immunité au cours du temps. De plus cette vaccination entraîne des effets secondaires dans la zone inoculée entraînant une méfiance des agriculteurs à l'égard de l'utilisation du vaccin (Kusiluka and Sudi, 2003; Teshale, 2005). Il a aussi été évoqué la possibilité d'une réversion de la virulence de cette souche vaccinale atténuée (Mbulu et al., 2004). Le dernier inconvénient de ce vaccin, et pas des moindres, est la difficulté de conservation d'un vaccin de qualité sur le terrain. En effet son utilisation nécessite une chaîne de froid rigoureusement respectée, ce qui est bien sûr très difficile à mettre en place et à vérifier sur le terrain (Rweyemamu et al., 1995). C'est pour toutes ces raisons que le développement d'un vaccin de nouvelle génération plus efficace comme, par exemple, un vaccin sous-unitaire basé sur un choix raisonné, est nécessaire pour un meilleur contrôle et l'éradication de la maladie.

Les méthodes de lutte contre la PPCC sont similaires à celles de la PPCB. La seule exception notable se trouve au niveau de la formulation qui contient des mycoplasmes *Mccp* inactivés et adjuvés à la saponine. Cette formulation a été utilisée avec succès chez des chèvres pour les protéger de la PPCC pour une durée d'un an (Rurangirwa et al., 1987) mais la séroconversion peut interférer avec le dépistage sérologique (Peyraud et al., 2014). Ces vaccins sont encore commercialisés aujourd'hui pour le contrôle de la PPCC en Afrique et en Asie mais leur production est trop coûteuse. Leur coût élevé compromet leur qualité et diminue la fréquence d'utilisation sur le terrain. Des essais similaires ont été menés contre la PPCB avec le développement d'un vaccin inactivé adjuvé avec de la saponine (Nicholas et al., 2003) ainsi qu'un autre essai avec un complexe immunostimulant (ISCOM) (Hübschle et al., 2003), mais malheureusement ces essais n'ont pas apporté les résultats escomptés. Les paramètres qui varient comme la méthode d'inactivation et la quantité de mycoplasmes injectés doivent jouer un rôle important dans la réponse immunitaire post vaccination. C'est pour cela qu'une étude a été réalisée en 2016 en comparant plusieurs méthodes d'inactivation (Mwirigi et al., 2016). Dans cette étude les auteurs ont utilisé une quantité identique de mycoplasmes inactivés, soit par la formaline, soit par la chaleur, et adjuvé avec

l'adjuvant de Freund. L'inactivation par la chaleur a donné des résultats de protection des animaux similaires à la souche vivante atténuée. Ces résultats suggèrent que l'on peut utiliser ce vaccin inactivé à la place du vaccin atténué pour s'affranchir du problème de conservation sur le terrain. Un essai de vaccin sous unitaire a été réalisé en utilisant l'enzyme membranaire l- α -glycerol-3-phosphate oxidase (GlpO) de *Mmm*, qui est possiblement impliquée dans la sécrétion d'H₂O₂ par les cellules de l'hôte au cours de l'infection (Mulongo et al., 2013). Cet essai vaccinal n'a pas fonctionné puisqu'il n'a pas permis une protection suffisante contre l'infection par une souche virulente. De plus, les anticorps produits contre la GlpO, bien que capables de reconnaître la protéine recombinante et la protéine native, ne sont malheureusement pas neutralisants.

La prévention sanitaire reste donc le seul moyen efficace pour éviter les mycoplasmoses pour lesquelles la vaccination n'est pas efficace ou pas accessible. De nombreuses mesures préventives peuvent alors être prises pour éviter la propagation des infections respiratoires : 1) Séparer les animaux de classes d'âge différentes (avec l'âge, les animaux peuvent devenir plus résistants à certains germes, mais ils peuvent toujours contaminer les plus jeunes), 2) Prévoir une quarantaine lors de l'achat des animaux avant de les mélanger avec d'autres animaux déjà présents dans l'élevage, 3) Isoler les animaux malades et 4) Eviter les lots trop grands qui peuvent provoquer du stress ainsi qu'un contact trop étroit et donc une transmission plus importante et rapide des agents pathogènes. Toutes ces recommandations sont assez facilement applicables dans les pays d'Europe et d'Amérique du nord. Par contre elles sont difficilement réalisables dans les pays africains où sévit la PPCB. En effet les troupeaux sont en contact avec la faune sauvage qui peut être porteuse de mycoplasmes et les mesures de quarantaine ne sont pas appliquées.

4.2 Traitements antibiotiques et résistances

Les traitements antibiotiques sont utilisés en amont de l'identification de l'agent pathogène en cause en se basant sur le diagnostic clinique (Nicholas and Ayling, 2003; Nicholas et al., 2008). Les traitements antibiotiques de première intention, non ciblés, comportent un risque d'échec important. Pour qu'il soit efficace, le traitement antibiotique doit être très précoce et mis en place pendant au moins cinq jours. Dans les pays du Sud, les traitements antibiotiques sont difficilement accessibles et leur utilisation ne se fait souvent

pas dans les conditions optimales (Mariner and Catley, 2004). De plus il a été montré que les traitements antibiotiques diminuaient les signes cliniques mais n'empêchaient pas la contagion et favorisaient l'apparition de maladies chroniques (Provost AP et al., 1987).

Différentes molécules d'antibiotiques peuvent être administrées aux animaux malades par différentes voies : orale, intramusculaire ou intraveineuse en fonction de leurs caractéristiques pharmacocinétiques. Les principales familles d'antibiotiques utilisables, c'est-à-dire ayant une bonne diffusion pulmonaire (extra et intracellulaire), sont les β -lactamines, les tétracyclines, les macrolides, les phénicolés et les quinolones. Pour rappel, les mycoplasmes sont insensibles aux β -lactamines puisqu'ils sont dépourvus de paroi cellulaire.

Les tétracyclines ont été largement utilisées en médecine vétérinaire car elles ont un large spectre d'action et sont capables de pénétrer les cellules eucaryotes (efficaces contre les bactéries intracellulaires). Elles sont restées longtemps efficaces contre *M. bovis* (Ayling et al., 2000). Cependant, la grande majorité des souches actuelles de *M. bovis* testées *in vitro* est devenue résistante (Khalil, 2016). Par contre chez *Mmm* les souches testées *in vitro* sont très sensibles à l'oxytétracycline malgré quelques disparités selon les isolats cliniques étudiés (Ayling et al., 2005).

Les macrolides sont parmi les premières molécules à être prescrites (De Briyne et al., 2014). Parmi ces molécules, la tylosine (TYL), un antibiotique naturel, et la tilmicosine (TILM), semi-synthétique dérivée de la TYL. La TIL a été démontré comme un des antibiotiques les plus efficaces contre divers isolats cliniques de *Mmm in vitro* (Ayling et al., 2005). Cette étude n'a pas révélé de cas de résistance à la TIL chez *Mmm*, bien que les souches utilisées ne proviennent pas de localités éloignées. Par contre on peut noter chez *M. bovis* l'émergence d'isolats cliniques résistants aux macrolides *in vitro* (Gautier-Bouchardon et al., 2014). Les résultats des traitements *in vivo* restent satisfaisants, d'autant plus que les macrolides ciblent aussi d'autres agents intervenant dans les affections respiratoires, notamment les pasteurelles et *Histophilus* (Apley and Coetzee, 2013).

Les quinolones sont prescrites contre un large spectre de bactéries y compris les mycoplasmes (Giguère and Dowling, 2013). L'ensemble des souches de *M. bovis* isolées en France par exemple reste sensible à l'enrofloxacin avec de très bons résultats *in vitro* (Gautier-Bouchardon et al., 2014; Hannan et al., 1997) et sur le terrain, la danofloxacin et la marbofloxacin. Chez *Mmm* la danofloxacin est aussi très efficace *in vitro* (Ayling et al., 2005).

La connaissance des mécanismes de pathogénicité des mycoplasmoses des ruminants, et notamment de *Mmm*, est encore très limitée. L'amélioration de ces connaissances est l'une des étapes nécessaires au développement de vaccins raisonnés plus efficaces. L'obtention de vaccins multivalents protégeant de façon simultanée contre plusieurs maladies permettrait une réduction importante des coûts de vaccination et un contrôle plus efficace de ces maladies. Les mécanismes d'invasion et de persistance de *Mmm* dans différentes cellules de l'hôte restent encore à élucider. L'obtention de mycoplasmes fluorescents faciliterait l'étude des interactions entre les mycoplasmes et leurs cellules hôtes.

L'objectif premier de ces travaux de thèse était donc la mise au point de mycoplasmes marqués grâce à différentes protéines fluorescentes. Le marquage devrait permettre de suivre directement les bactéries par microscopie confocale et cytométrie en flux lors de l'infection des cellules de l'hôte facilitant, entre autre, l'étude des mécanismes d'adhésion, de pénétration éventuelle, ainsi que d'une possible multiplication ou survie intracellulaire.

Le second objectif était d'évaluer les mycoplasmes comme vecteurs vaccinaux, en utilisant le modèle de la peste des petits ruminants (PPR), une maladie virale qui affecte les chèvres et présente un impact et une distribution similaire à la PPCC. La production de mycoplasmes recombinants exprimant des antigènes de surface du virus de la PPR nous servirait de preuve de concept d'un vaccin multivalent.

La réalisation de ces deux objectifs reposait sur une stratégie commune, à savoir, l'expression hétérologue de gènes par les mycoplasmes. Le prérequis indispensable à l'obtention des objectifs de cette thèse était la mise au point et la validation d'un outil pour l'expression de gènes chez les mycoplasmes du groupe mycoides, voir le plus largement possible au sein des *Mollicutes*.

Partie II Matériels et Méthodes :

1. Matériel biologique

1.1 Souches bactériennes

- *Escherichia coli* :

La souche d'*E. coli* dérivée de DH10B [$\Delta(ara-leu)$ 7697 *araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)] (New England Biolabs) a été utilisée lors des étapes de construction et de propagation des différents plasmides. Ces bactéries ont été cultivées en milieu liquide ou solide Luria-Bertani (LB) (**Annexe 2**) à 37°C, en présence de différents antibiotiques selon les plasmides utilisés. Les souches transformées sont conservées à -80°C dans des billes en céramique (MicrobankTM).*

- *Mycoplasma* spp :

Les souches sont conservées à -80°C (billes MicrobankTM) ou à -20°C lyophilisées. Ces souches ont été cultivées dans du milieu PPLO enrichi composé de 21 g/L de PPLO broth (Difco) sans « cristal violet » (milieu de base, 70% du volume final), auquel est rajouté 30% de supplément (**annexe 3**). Les géloses PPLO sont réalisées avec le même milieu que précédemment avec ajout d'1 gramme d'agar noble.

Mmm, *Mmc* et *M. bovis* sont cultivées dans une étuve à 37°C, 5% de CO₂ et avec une humidité maximale durant 1 à 10 jours en fonction du type de culture (liquide ou solide) et de l'état du prélèvement.

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides*

Trois souches différentes de *Mmm* ont été utilisées au cours de ce travail :

- PG1^T(CIRAD, France) est la souche type de *Mmm* (de *Mycoplasma mycoides* et du genre *Mycoplasma*) dont la date et lieu d'isolement ne sont pas connus.

- 8740-Rita a été isolée d'un cas de pleuropneumonie contagieuse bovine au Cameroun, en 1987 (Dr.Aboubakar, Laboratoire National Vétérinaire, Garoua, Cameroon).

- RΔK- est une souche mutante dérivée de Rita n'exprimant plus une lipoprotéine immunodominante (Lpp) et dépourvue du gène de résistance antibiotique introduit lors de la mutagénèse (CIRAD, France).

Mycoplasma mycoides subsp. capri, sérovar LC

- 7302 a été isolée d'un cas de pleuropneumonie chez une chèvre à Lisbonne, Portugal en 1973 (CIRAD, France).

Mycoplasma bovis

- Oger2 est une souche virulente isolée d'un cas de pneumonie chez un veau dans les Ardennes, France, en 1975 (CIRAD, France).

1.2 Cellules bovines :

- EBL « Embryonic bovine lung »

Les cellules EBL (DSMZ) sont une lignée cellulaire embryonnaire bovine issue de poumons d'un fœtus de 7 mois. Cette lignée est adhérente et se cultive en monocouche avec du milieu RPMI 1640 supplémenté de 15% de sérum fœtal bovin. Les cellules doivent être divisées tous les 3 jours et incubées à 37°C et 5% de CO₂.

- Macrophages dérivés de monocytes bovins

Les macrophages sont dérivés de monocytes issus de prélèvement sanguin chez des donneurs bovins sains, de race Jersiaise. Ces bovins sont élevés dans l'animalerie du CIRAD. Le sang est collecté depuis la veine jugulaire dans des tubes héparinés BD Vacutainer (Beckton Dickinson, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les procédures d'expérimentation animale pour l'élevage et la collecte de sang ont été approuvées par le comité d'éthique régional du Languedoc Roussillon (CE-LR#36) dans le projet #12ANI01.

Les monocytes sont ensuite isolés du sang par sélection positive des cellules exprimant le récepteur CD14. Brièvement, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont

centrifugées sur Histopaque (Sigma), puis incubées avec un anti-CD14 humain couplé à des particules super-paramagnétiques (Miltenyi-Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Les cellules d'intérêt ainsi couplées aux particules sont ensuite isolées au travers d'une colonne Midimacs (Miltenyi-Biotech) selon les recommandations du fournisseur. La pureté des cellules isolées a été évaluée par cytométrie en flux et a été d'au moins 98% de CD14+ à chaque expérience. La viabilité cellulaire a elle aussi été vérifiée par marquage à l'iodure de propidium (IP) et été supérieure à 95%. Les CD14+ obtenues sont ensuite cultivées dans du milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Life Technologies, France), supplémenté avec 2mM de L-glutamine, 50 µM de 2-mercaptoethanol 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Eurobio AbCys, France) et 50 µg/ml gentamicine (Life technologies, France). Les cellules sont ainsi mises en culture à 3 millions par puits de plaque 6 puits ou 1 million par puit de plaque 24 puits durant 6 jours à 37°C avec 5% de CO₂. La moitié du milieu est remplacé par du milieu frais après 3 jours de culture. Au bout de 6 jours de culture dans ces conditions les cellules sont différenciées en macrophages.

1.3 Plasmides

Tous les plasmides utilisés dans ce travail ont été gracieusement fournis par l'INRA de Bordeaux.

- Le plasposon pMT85/2res

Le pMT85/2res est un plasmide de 5.2 kpb qui contient une transposase (TnpA). Celle-ci permet une insertion aléatoire dans le génome des mycoplasmes et généralement en une seule copie. Le plasmide ne se réplique pas chez les mycoplasmes mais seulement chez *E. coli* (grâce à l'origine de répllication colE1). La transposase est délimitée par deux séquences inversées répétées (IR). Cette conformation originale fait en sorte que la transposase ne soit pas intégrée lors de la transposition, ce qui est essentiel pour obtenir des insertions stables. La séquence insérée dans le génome comporte un gène de résistance à la gentamicine, kanamycine et tobramycine (*aacA-aphD*) pour la sélection des mutants. Deux séquences « res » permettent après utilisation d'une enzyme, la résolvasse, une excision du gène de résistance antibiotique (**figure 7**). Ce plasmide a entièrement été re-séquencé lors de la thèse (amorces non présentées) et des corrections ont été apportées aux séquences.

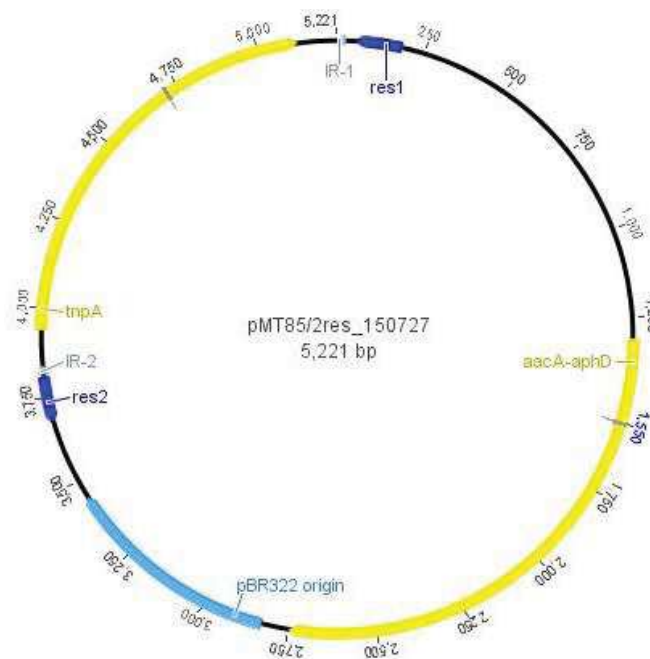


Figure 7: Carte génétique du plasposon pMT85/2res (Geneious).

Ce plasmide contient le gène *aacA-aphD* de résistance à la gentamicine, kanamycine et tobramycine, l'origine de répllication colE1 *pBR322*, une transposase TnpA délimitée par deux séquences inversées répétées et deux séquences « res », cibles de la résolvasse TnpR.

- Le plasmide pCJ15

Le pCJ15 est un plasmide réplcatif navette de 8.2 kpb qui contient l'origine de réplcation *colE1* pour sa réplcation dans *E. coli*, ainsi que l'origine de réplcation chromosomique (*OriC*) de *Mmm*. La présence d'un gène de résistance à la tétracycline (TetM) permet de sélectionner les bactéries transformées. Le pCJ15 contient aussi un gène codant pour une résolvasse (TnpR) (**figure 8**). Cette enzyme catalyse l'excision et élimination du fragment d'ADN situé entre les deux séquences « res » insérées dans le chromosome des mutants produits avec le pMT85/2res. Cela permet d'éliminer les séquences ColE1 ori et *aacA-aphD* préalablement intégrés. Une fois la « résolution » effectuée, il reste seulement la séquence « res » entre les deux IR (**figure 8**). La résistance antibiotique est donc retirée tout en empêchant la synthèse du gène dans lequel il y avait eu l'insertion. L'absence de résistance antibiotique est nécessaire pour certaines applications, comme l'utilisation dans des vaccins ou les analyses in-vivo.

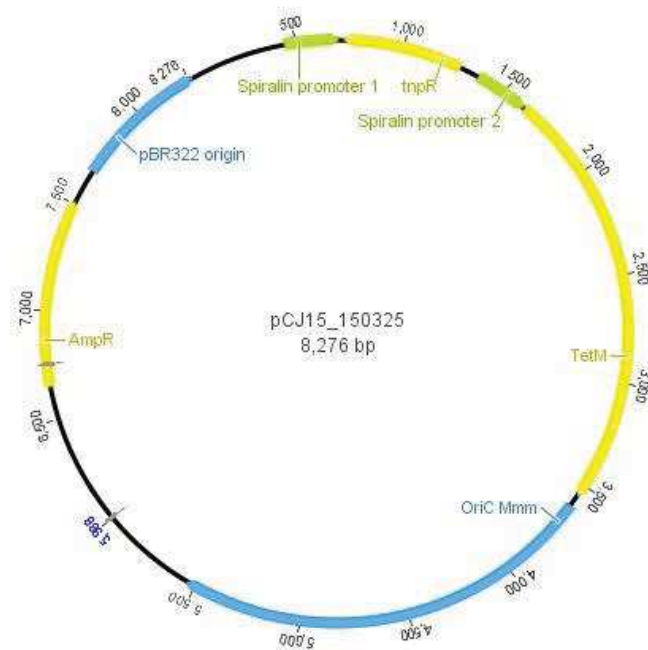


Figure 8 : Carte génétique du plasmide résolusif pCJ15 (Geneious).

Ce plasmide contient le gène *TetM* de résistance à la tétracycline, également le gène de résistance à l'ampicilline, *AmpR* ainsi que l'origine de réplcation *colE1* *pBR322*, l'origine de réplcation chromosomique chez *Mmm* *OriC Mmm*, et le gène de la transposase sous contrôle du promoteur spiraline.

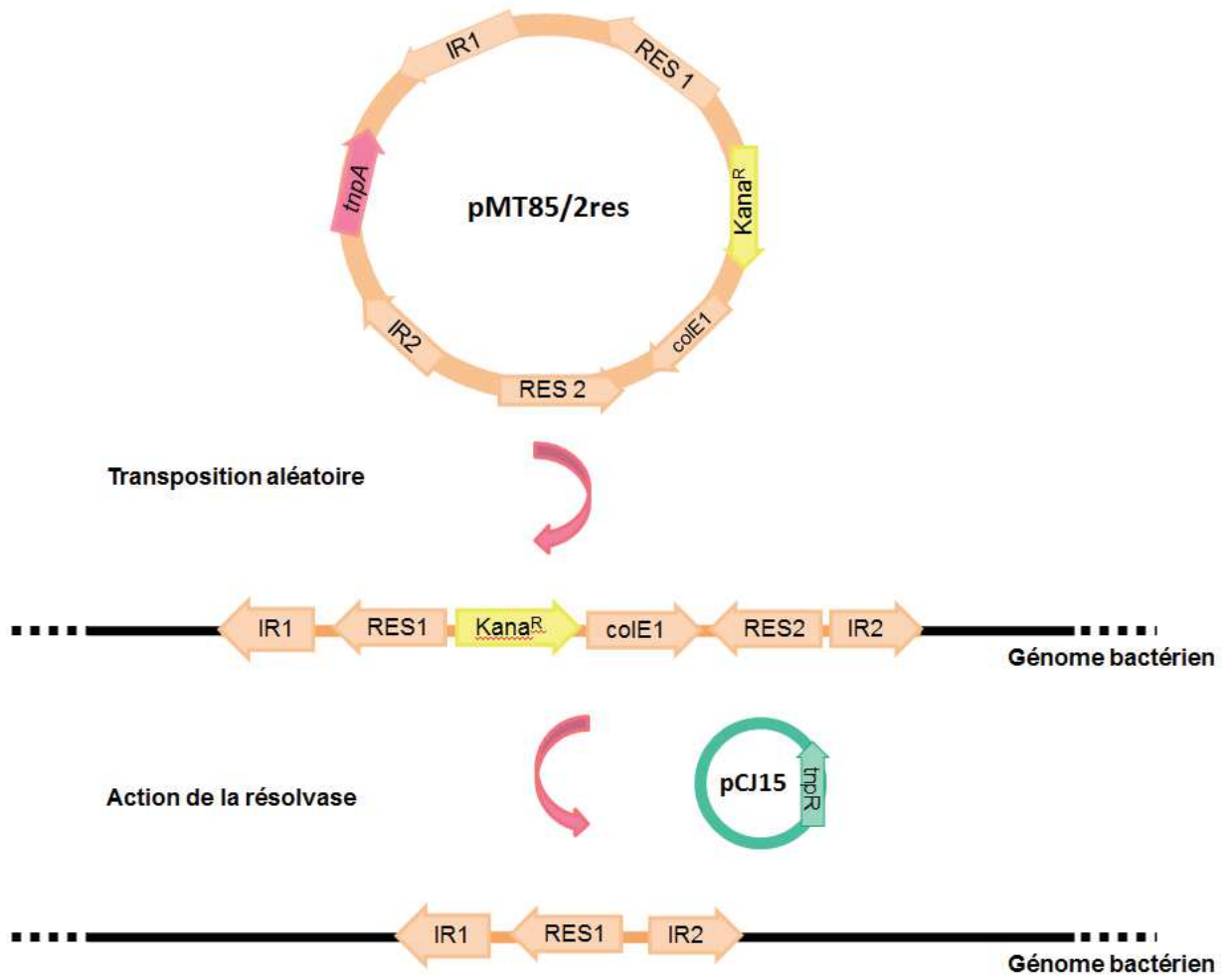


Figure 9 : mécanisme de mutagénèse aléatoire non marquée pMT85/2res couplé à pCJ15.

- Le plasmide pPS3.1

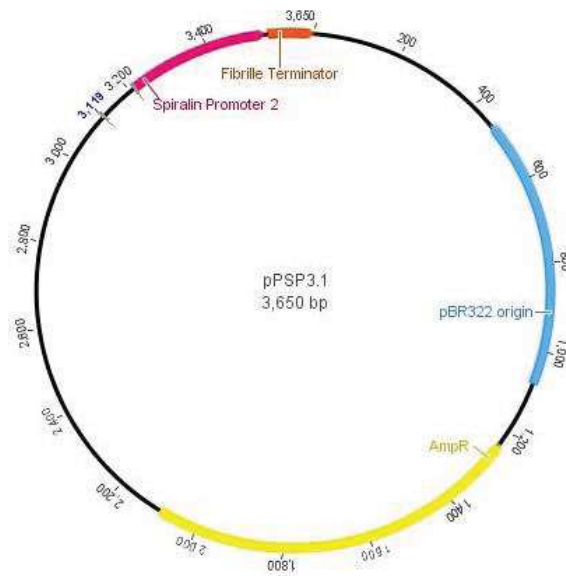


Figure 10 : Carte génétique du plasmide réplcatif pPS3.1.

Contenant le promoteur du gène de la spiraline et le terminateur du gène de la fibrille de *S. citri*. Il contient le gène AmpR qui lui confère la résistance à l'ampicilline. (Geneious)

- Le plasmide pMYO1

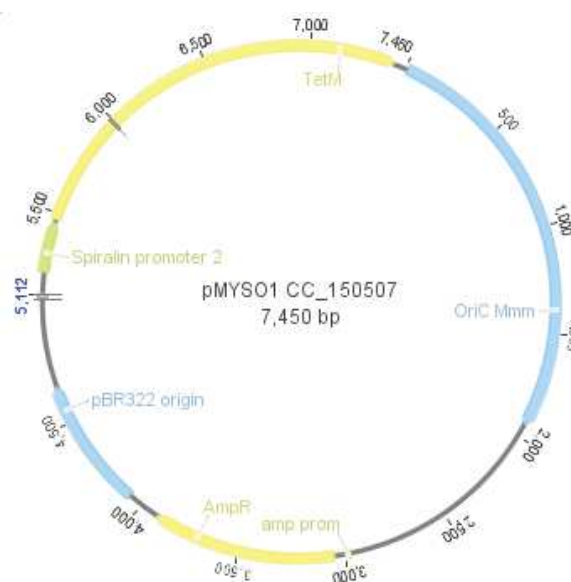


Figure 11 : Carte génétique du plasmide réplcatif pMYO1. (Geneious)

pMYO1 contient l'origine de réplcation pBR322 pour *E. coli* et l'OriC de *Mmm* ainsi que les gènes de résistance à la tétracycline (sous contrôle du promoteur du gène de la spiraline de *S. citri*) et à l'ampicilline.

- Le plasmide pCC1

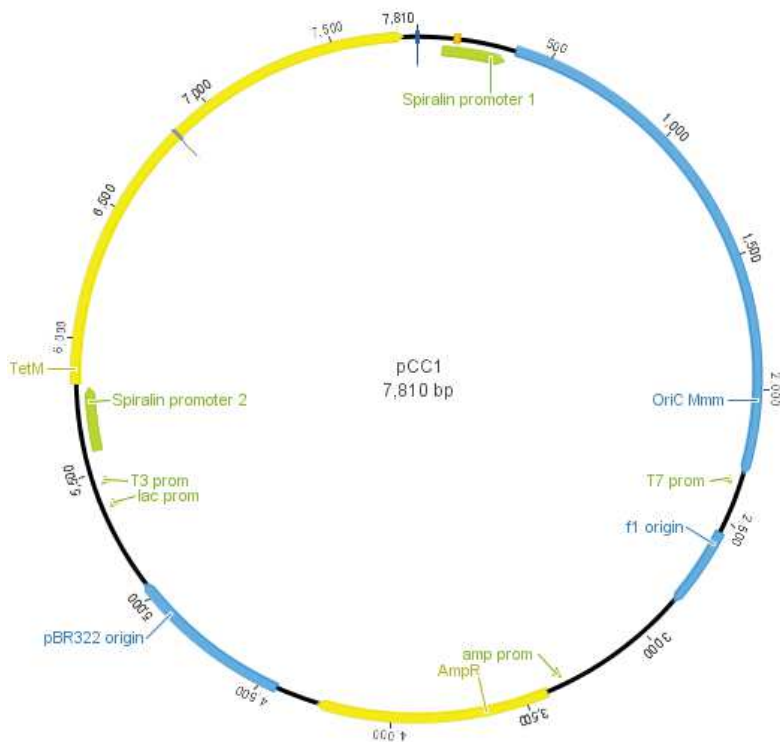


Figure 12 : Carte génétique du plasmide réplicatif pCC1. (Geneious)

pCC1 contient l'origine de réplication pBR322 pour *E. coli* et l'OriC de *Mmm* ainsi que les gènes de résistance à la tétracycline (sous contrôle du promoteur du gène de la spiraline de *S. citri*) et à l'ampicilline. La différence avec le plasmide pMYO1 c'est qu'il contient en plus un second promoteur spiraline suivi d'un site de reconnaissance à l'enzyme de restriction XhoI pour l'insertion de gènes.

2. Amplification par PCR

Les amorces utilisées pour la réalisation des différentes PCRs sont répertoriées dans la **table 3** ci-après. Elles ont été sélectionnées en utilisant les outils disponibles dans le logiciel Geneious R6 et synthétisés par Sigma-Aldrich.

- PCR classique

Dans le cas d'amplification de séquences permettant la vérification de la présence d'un insert dans le plasmide, la PCR classique a été utilisée avec la *Taq* polymérase (Quiagen) selon les recommandations du fournisseur. 25 cycles de PCR sont réalisés avec une concentration finale d'amorces de 0.4µM et une température d'hybridation spécifique à chaque couple d'amorces (**Table 3**). Le temps d'élongation varie en fonction de la taille du produit, environ 1min pour 1kpb.

- PCR pour clonage

Pour la création et l'amplification d'insert par PCR qui seront ensuite destinés à être clonés, la Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Life Technologies) a été utilisée selon les recommandations du fournisseur. Cette polymérase possède à la fois une forte processivité et une activité d'édition (exonucléase 3'-5') qui permet de réduire les risques d'erreur liés à l'amplification d'environ 50 fois en comparaison avec une *Taq* polymérase classique. La température d'hybridation utilisée pour un couple d'amorce est celle du T_m le plus bas du couple auquel on ajoute 3°C, conformément à ce qui est recommandé par le fournisseur de la polymérase. Les séquences des amorces utilisées pour réaliser les clonages sont décrites dans la **table 3**.

- Tableau des amorces utilisées au cours de ce travail

Amorces	Séquences 5'-3'	Tm
SpeI_Ptuf_F	TTTACTAGTTATTTTTGAATTAAGTATTAATAAGTG	50°C
NcoI_Ptuf+_R	TTTCCATGGAGGTAACTACGGTCAAATTG	60°C
MCS_Ptuf+_Tfib_F	GTAGTTTACCTCCATGGAAAATCGACCCGCGGCTTAAGAAA TTAAAGTTGGTTCATTC	70°C
Tfib_XbaI_R	GGGTCTAGATTTAAAAAATAAAAAACAACCTTTTGG	57°C
NcoI_Lpp_F	CGCCCATGGATGAAAAAGTTATTAATATC	60 °C
AflII_Lpp_R	CGCCTTAAGTTAAAGGTTCATTTTG	58°C
SapI_Ptuf_F	GGGAGCGGAAGAGCTAGCTTTGGACACACACTAG	65°C
SphI_Tfib_R	GGGGCATGCGGATACATTTTTATGAGATCCAC	63°C
XhoI_Lpp_F	CGCCTCGAGATGAAAAAGTTATTAATATC	55°C
XhoI_Lpp_R	CGCCTCGAGTTAAAGGTTCATTTTG	56°C
GFP2opt_F	GAACCATGGATGTCAAAGGAG	53°C
GFP2opt_R	GGGCTTAAGTTATTTATATAATTCATC	50°C
mCherry_F	GAACCATGGATGGTTTCAAAGGAG	58°C
mCherry_R	GGGCTTAAGCTATTTATATAATTCATCCATTC	55°C
mKO2_F	GGGCCATGGATGGTTTCAGTTATTAACC	61°C
mKO2_R	GGGCTTAAGTTATGAATGAGCAACAGCATC	61°C
mNeonGreen_F	GAACCATGGATGGTTTCAAAGGAG	58°C
mNeonGreen_R	GGGCTTAAGTTATTTATATAATTCATCCATTC	53°C
Hopt_peptidsignal_Mmm_F	AGGAGTTGCTGCTACTGTTGT	52°C
HPPR-opt-F	GATGTCAGCTCAAAGAGAAAG	54°C
HPPR-opt-R	CTTAAGTTAACTGGATTAC	48°C

Table 3 : Tableau des séquences des amorces utilisées pour ces travaux de thèse

Les sites de reconnaissance des enzymes restriction introduits pour le clonage sont indiqués selon le code couleur suivant : jaune : SpeI, vert clair : NcoI, rouge : Sall, gris : SacII, rose : AflII et vert foncé : XbaI.

- Purification des produits PCR

Les amplicons obtenus ont été purifiés sur gel d'agarose (1 à 2% selon leur taille) puis sur colonne avec le PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

3. Analyse de l'ARNm des mycoplasmes

- Extraction des ARN

Les ARN totaux de 1mL de culture de 24 heures des souches 7302 de *Mmc* WT et mutants H-PPRV ont été extraits avec le kit RNeasy® de chez Qiagen selon les recommandations fournisseurs. Le rendement en ARN a été mesuré après dilution à l'aide du Qubit® RNA HS Assay Kit et du fluorimètre Qubit®. Ce dosage est hautement sélectif pour l'ARN et ne quantifie pas l'ADN, ni les protéines, ni les nucléotides libres. Des contaminants courants tels que les sels, les nucléotides libres, les solvants, les détergents ou les protéines, sont bien tolérés dans le dosage.

- Digestion des ADN, analyse de la qualité et quantification des ARN

Les ARN totaux extraits et quantifiés sont alors mis en présence de DNase pour enlever l'ADN résiduel et exclure des résultats faussement positifs après la RT-PCR. L'ADN est enlevé à l'aide du kit TURBO DNA-free™ d'Ambion selon les recommandations fournisseur. Ce kit contient les réactifs pour la digestion efficace et complète d'ADN ainsi que le retrait de l'enzyme et des cations divalents après digestion. Les ARN sont ensuite dosés au fluorimètre Qubit® comme précédemment avant de vérifier leur qualité au bioanalyseur à l'aide d'une puce ARN.

- Transcriptase inverse pour la synthèse d'ADNc

L'obtention d'ADNc à partir de l'ARNm extrait puis purifié à partir de *Mmc* est utilisé comme matrice dans le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis en suivant le protocole du fournisseur Thermo scientific en utilisant les amorces aléatoires fournies pour obtenir tous les ADNc. Une étape supplémentaire utilisant la Klenow est effectuée pour synthétiser le brin complémentaire du premier brin d'ADNc.

- Amplification PCR de l'ADNc

L'amplification PCR finale est faite à l'aide de nos amorces spécifiques Hopt_peptidsignal_Mmm_F ou Hopt-F avec Hopt-R selon les conditions définies dans la **table 3**.

4. Extraction et purification de l'ADN mycoplasmique

L'ADN génomique des différentes espèces de mycoplasme étudiés au cours de ces travaux a été extrait en suivant les recommandations fournisseur du kit d'extraction NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel pour l'extraction chez les bactéries. Ce Kit repose sur le principe de précipitation d'ADN et de purification sur colonne avec membrane de silice. L'extraction a été faite à partir de 2 mL de culture de 24 heures en suivant le protocole fournisseur optimisé pour une utilisation chez les bactéries.

5. Digestion enzymatique et clonage

Les plasmides et produits PCR ont été digérés par différentes enzymes de restrictions *SpeI*, *NcoI*, *AflII*, toutes fournies par New England Biolabs, à 37°C pendant le temps recommandé par le fournisseur suivant les enzymes. Toutes les enzymes s'utilisent avec le même tampon cutsmart (New England Biolabs) ce qui permet de réaliser des doubles digestions (*i.e.*, *AflII*/*NcoI*). Les produits des digestions enzymatiques réalisées en amont du clonage sont purifiés sur gel d'agarose 1-2% puis sur colonne avec le kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les produits ainsi digérés présentent des extrémités cohésives non compatibles dans le cas des doubles digestions et, d'extrémités compatibles pour les simples digestions. Le plasmide simplement digéré par l'enzyme *SpeI* nécessite un traitement à la phosphatase alcaline CIAP (Invitrogen) (1 unité de CIAP pendant 5 minutes à 37°C) pour enlever les groupements phosphate aux extrémités et limiter la fermeture du plasmide sur lui-même. L'enzyme est ensuite désactivée par la chaleur. Pour tous les clonages 50ng de plasmide digéré sont mis en présence d'inserts eux aussi digérés à un ratio vecteur/insert de 1/3 en molarité. Une unité de T4 DNA ligase (Invitrogen) est ajoutée au mélange vecteur/insert pour permettre la ligation. La ligation s'effectue à 14°C durant 16 heures. Le produit de ligation est ensuite ajouté aux bactéries compétentes pour la transformation de celle-ci.

6. Détermination du lieu d'insertion du transposon

Pour séquencer le site où a eu lieu l'insertion du transposon dans le génome des différentes souches de mycoplasmes, l'ADN total a été digéré par l'enzyme de restriction BclI. Un adaptateur a été généré par hybridation de deux oligonucléotides « Adapt1BclI » et « Adapt2BclI » à 100 µM chacun (**table 4**). L'hybridation a été faite durant 5 minutes à 100°C puis le produit a été ramené à température ambiante. Ce produit a alors été ligué à l'ADN de mycoplasme préalablement digéré. Ensuite le produit de cette ligation a servi de matrice à une PCR utilisant les amorces BclI-primer et MT85-R (**table 4**). La PCR a été réalisée dans des conditions standard durant 35 cycles à une température d'hybridation de 52°C et un temps d'élongation d'une minute. Le produit PCR ainsi obtenu a été séquencé avec l'amorce MT-85R par la société Genewiz. Les séquences résultantes du séquençage ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Geneious. Les séquences correspondantes au plasposon ont été éliminées et le reste de la séquence a été aligné avec le génome complet de la souche de référence pour chaque espèce étudiée.

Amorces	Séquences 5'-3'
BclI_Primer	CGTGGGATCGTAACGTTGATCA
MT85_R	CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACC
Adaptateurs	
Adapt1BclI	CTCGTACGTGGGATCGTAACGTT
Adapt2BclI	GATCAACGTTACGATCCC

Table 4 : séquences des amorces et adaptateurs utilisés pour la détermination du lieu d'insertion du système pMT/exp

7. Transformation des souches bactériennes

- Transformation d'*Escherichia coli*

La transformation des cellules compétentes NEB 10-beta Competent *E. coli* (New England Biolabs) s'est effectué selon le protocole du fournisseur. Le tube contenant 50 µL de cellules compétentes a été incubé 10 minutes dans la glace jusqu'à la décongélation complète des cellules, puis l'ADN plasmidique a été ajouté aux cellules à raison de 5 µL maximum pour 100 ng d'ADN maximum. Le tube a été agité délicatement 4 à 5 fois puis le mélange a été incubé encore 30 minutes dans la glace sans agitation. Les cellules ont ensuite été soumises à un heat shock à 42°C pendant exactement 30 secondes avant d'être disposées dans la glace pendant encore 5 minutes. 950 µL de milieu SOC (New England Biolabs) à température ambiante a été ajouté aux cellules, puis incubé à 37°C sous une forte agitation pendant 1 heure. Les cellules ont ensuite été étalées sur des milieux gélosés LB avec l'antibiotique adapté pour la sélection des transformants. Pour une transformation avec le plasposon pMT85/2res la kanamycine a été utilisée à une concentration de 100 µg/mL. Les cellules ont été incubées la nuit à 37°C.

- Transformation des mycoplasmes

Le protocole de transformation au PEG qui a été utilisé ici est adapté de celui décrit par Dybvid et ses collaborateurs (King and Dybvig 1994). Une préculture de 48 heures (trois à cinq dilutions au 1/10) a tout d'abord été effectuée à partir d'une culture congelée de mycoplasmes (billes). La dernière dilution présentant une turbidité visible a alors été ensemencée en trois dilutions successives au 1/10. Arrivée en fin de phase exponentielle (environ 24 heures) des aliquots de 4 ml de culture (mélanges des deux dernières dilutions présentant une turbidité) ont été centrifugés à 10 000 *g* pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans 1 mL de solution ST stérile (Saccharose 500mM ; Tris HCL, pH 6,5 à 10mM). Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, les culots ont été repris dans 250 µl de solution stérile de CaCl₂ à 0.1 M, puis, incubés dans la glace pendant 30 minutes. Les tubes tests pour la transformation ont été préparés avec 10 µg d'ARN de transfert de levure (ARNt) et 20 µg d'ADN plasmidique dans un volume final maximal de 20µL. Un tube témoin contenant seulement l'ARNt a été réalisé en parallèle des

tubes tests. Une fois l'incubation des cellules terminée, les 250 µl de suspension de mycoplasmes ont été ajoutés aux différents tubes de transformation. 2 ml de PEG 8.000 à 0.7 g/mL (dans Tris HCL 0,01M, pH 6,5) ont alors été ajoutés au mélange. Après 2 minutes maximum d'incubation à température ambiante et une légère agitation par rotation des tubes, 10 ml de solution ST ont été ajoutés aux différents tubes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 12 000 *g* durant 12 minutes à température ambiante. Après l'élimination du surnageant, les cellules ont de nouveau été rincées avec la solution ST et centrifugés comme précédemment. Une fois le deuxième rinçage effectué les culots ont été re-suspendus dans 500 µL de milieu PPLO sans antibiotiques et incubés à 37°C pendant une heure pour *Mmc* ou deux heures pour *M.bovis* et *Mmm*. A la fin de l'incubation 100 µL de culture non diluée, ainsi que des dilutions à 10^{-1} et 10^{-2} ont été étalés sur des milieux PPLO solide contenant l'antibiotique correspondant à la résistance confiée par le plasmide utilisé, puis placés à 37°C dans une étuve. Pour les transformations avec les différents plasposons la kanamycine a été utilisée à une concentration de 100 µg/mL pour *Mmm* et 250 µg/mL pour *Mmc* et *M.bovis*. Parallèlement 20 µL des dilutions 10^{-4} à 10^{-8} sont déposées sur des géloses sans antibiotique afin de quantifier le nombre total d'unités formatrices de colonies (UFC) contenues dans le mélange de transformation. Aussi, 20 µL des dilutions 10^0 à 10^{-4} ont été déposées sur des géloses avec l'antibiotique pour quantifier le nombre d'UFC de transformants obtenus. Ceci a permis de calculer l'efficacité de la transformation, qui est exprimée en nombre de transformants/UFC totales. Après 5 à 10 jours d'incubation à 37°C, les mycoplasmes transformés sont visibles à l'œil nu sous forme de colonies. Celles-ci ont alors été remises individuellement en culture liquide avec l'antibiotique nécessaire à la pression de sélection du plasmide en question.

8. Purification et analyse de l'ADN plasmidique amplifié par *E. coli*

L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries avec le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) suivant les instructions du fournisseur avec une élution dans 50 µL. La présence de l'insert dans l'ADN plasmidique a été vérifié par digestion enzymatique lorsque cela a été possible ou par PCR avec des amorces spécifiques de l'insert suivis d'une migration sur gel d'agarose 1%.

9. Vérification des séquences d'ADN :

La validité des séquences obtenues lors de nos diverses manipulations moléculaires a été vérifiée par séquençage Sanger par la société Genewiz. Les différentes amorces utilisées pour obtenir les séquences sont listées dans la **table 5** ci-après.

Noms des amorces	Séquences 5'-3'
pMT85-Spelcloning_F	AACCCATAGCTTTGGACACAC
MT85_F	CTAACTCACAGTAATTGCGGGTGG
H-PPR-middle-R	CCTGGATCTGAAGCTAAATC

Table 5 : Séquences des amorces utilisées pour la vérification de l'intégrité des séquences par séquençage de sanger.

10. Analyse des protéines de mycoplasmes

- Extraction et dosage des protéines

Des cellules bactériennes (10 mL à 48 heures de culture) sont collectées par centrifugation (10000 g, 10 minutes à 4°C). Le culot est remis en suspension dans 10 mL de PBS, puis, les cellules sont centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment. Le même lavage est répété 3 fois, puis les cellules sont remises en suspension dans 100 µl de PBS et lysés en ajoutant 1% de SDS. Les lysats cellulaires sont ensuite chauffés de 30 minutes à 1 heure à 60°C. Le dosage des protéines se fait ensuite par la méthode à l'acide bicinchoninique (Kit Pierce) selon la recommandation du fournisseur.

- Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes

Des gels SDS-PAGE pré coulés commerciaux Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels 4-15% (Bio-Rad) ont été utilisés pour la migration des extraits protéiques de différentes souches de mycoplasmes afin de tester l'expression de certaines protéines au cours de cette étude.

Les différents échantillons sont normalisés à une concentration de 4 µg/µL dans du PBS puis dilués au ½ dans du tampon de Laemmli 2X (Bio-Rad) et chauffés à 95°C durant 5 minutes. Un total de 20-40 µg de protéines (10 µL) a été déposé par piste sur les gels SDS-PAGE ainsi qu'un marqueur de taille Pre-stained Kaleidoscope (Bio-Rad). Les protéines ont été migrées dans une cuve contenant du tampon de migration (Life technologies) pendant 30 minutes à 30mA, puis 1 heure à 60mA (ampérage constant).

- Détection des protéines par western-blot

Après la migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0.45 µm, Bio-Rad). Le transfert s'effectue pendant 30 minutes à 100mA (ampérage constant) dans un appareil de transfert semi-sec (Fast semi-Dry Blotter de Thermo Scientific) dans du tampon de transfert (Fast Semi-Dry Transfer Buffer Pierce). L'efficacité du transfert est vérifiée par la présence du marqueur de taille coloré Kaleidoscope (Bio-Rad) sur la membrane. La membrane est ensuite incubée dans un tampon saturant (PBS Lait écrémé 5%, lactalbumine 1%, Tween 20 0.1%) 2 heures à température ambiante, puis rincée avec du tampon de lavage (PBS 0.01% Tween 20). La membrane ainsi saturée est incubée toute une nuit à 4 °C dans du tampon de dilution (PBS lait écrémé 1%, Tween 20 0.01%) contenant l'anticorps primaire (l'anti Lpp est utilisé au 1/1000^{ième} ; le monoclonal anti H-PPRV est utilisé au 1/100^{ième} ; Un serum hyper immun d'animaux convalescent PPR est utilisé au 1/50^{ième}). La membrane est ensuite lavée 4 fois 10 minutes dans du tampon de lavage, puis, incubée 1 heure 30 minutes en présence de l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-chèvre couplé à la peroxydase HRP Dako) au 1/500^{ième} dans du tampon de dilution. Après 4 lavages de 10 minutes de la membrane avec du tampon de lavage, la réaction est révélée par chimiluminescence avec le substrat Luminata Forte Western HRP (Merk Millipore), puis révélé à l'aide du G:BOX Chemi (Syngene).

- Détection des protéines par spectrométrie de masse

20 µg de protéines totales des souches de *Mmc* (WT, H13, HP6) sont diluées dans du Laemmli 2X (biorad) puis sont déposées sur gel SDS-PAGE Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels 4-15% (Bio-Rad). Une courte migration de 20 minutes à 30mA est effectuée pour commencer à séparer les protéines. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie puis à

l'aide du marqueur de taille Pre-stained Kaleidoscope (Bio-Rad) 3 bandes de gels sont découpées correspondant à des tailles comprises entre 45 et 80 kDa. Les 3 échantillons ont été repris sur la plateforme de spectrométrie de masse protéomique de l'INRA dans 10µl d'acide formique 2%. 2µL d'échantillon ont été injectés pour une analyse en ligne en utilisant une HPLC nano débit (NCS 3000, Thermo Fisher) couplée à un spectromètre de masse ayant une source nanoelectrospray (QExactive plus, Thermo Fisher Scientific). L'ensemble du processus d'analyse et les résultats ont été contrôlés et validés par le personnel de la plateforme. Les résultats obtenus ont été analysés suivant deux interrogations : une sur la banque SwissProt2016 et sur une banque constituée des deux séquences virales « protéine H PPRV » avec le peptide signal endogène ou celui de la lipoprotéine Lpp de *Mmm* à l'aide du moteur de recherche Mascot via le logiciel ProteomeDiscoverer 1.4.

11. Infection des cellules bovines par les mycoplasmes

Les cellules sont d'abord lavées 2 fois au PBS préalablement chauffé à 37°C. Les mycoplasmes utilisés lors des infections sont en fin de phase exponentielle et sont eux aussi lavés au PBS avant d'être resuspendus dans la quantité de PBS souhaité selon la MOI (Multiplicity of infection) désirée. La suspension infectieuse est alors déposée sur les cellules en petit volume (¼ du volume de milieu de culture habituel, 250 µL pour une plaque 24 puits par exemple) durant 30 minutes à 37°C avec 5% de CO₂. Une fois l'incubation terminée du milieu avec ou sans antibiotique selon l'analyse est rajouté aux cellules infectées et l'incubation se poursuit jusqu'à 72 heures selon les expériences.

12. Analyse des cellules par cytométrie en flux

Toutes les analyses ont été effectuées sur un cytomètre en flux FACSCanto II (BD Biosciences, USA) avec une longueur d'onde d'excitation à 488nm une détection utilisant le filtre 530/30nm pour la fluorescence verte et 585/42 pour la rouge. Un minimum de 10 000 évènements dans la fenêtre souhaitée (débris cellulaires exclus) a été enregistré et analysé avec le logiciel FACSDiva version 6 de BD Biosciences.

- Cellules bovines

L'analyse des cellules bovines par cytométrie en flux se fait après 2 lavages des cellules avec du PBS chauffé à 37°C, puis grattage des cellules macrophagiques à l'aide d'un

râteau ou décollement à la trypsine des lignées cellulaires adhérentes. La viabilité des cellules a été mesurée par exclusion d'iodure de propidium (IP) à 2µg/mL et le pourcentage de cellules mortes mesuré par cytométrie en flux.

- Mycoplasmes

Les cultures de mycoplasmes en milieu liquide sont récoltées en fin de phase exponentielle et lavées deux fois avant d'être resuspendues dans du PBS et passés au cytomètre. Les réglages du cytomètre pour l'analyse des mycoplasmes sont différents de ceux utilisés pour les cellules eucaryotes en raison de leur taille notamment. L'échelle d'analyse doit être logarithmique et les petits éléments ne doivent pas être confondu avec les débris, il faut donc ajuster les réglages des photomultiplicateurs PMT.

13. Détermination du titre en mycoplasmes

Pour connaître la quantité de mycoplasmes contenue dans nos différentes cultures et surnageants nous avons réalisés des titrages classiques sur milieu gélosé PPLO. Pour réaliser les titrages les mycoplasmes seuls ou les cellules infectées par les mycoplasmes ont été passés plusieurs fois au travers d'une aiguille 25G pour une homogénéisation optimale et une lyse mécanique des cellules. Ensuite 20 µL de différentes dilutions 10^0 à 10^{-8} (selon le titre attendu) sont déposées sur les géloses afin de quantifier les unités formatrices de colonies (UFC). Après 2 à 5 jours d'incubation à 37°C, selon les espèces de mycoplasmes, les UFC sont comptées. Les dilutions présentant un minimum de 15 colonies sont comptabilisées.

14. Observation par microscopie à fluorescence et microscopie confocale

- Microscopie à fluorescence

L'observation directe des colonies de mycoplasmes après 3 jours d'incubation sur gélose PPLO a été faite sur un microscope inversé AxioVert A1 (Carl Zeiss, Allemagne) équipé à la fois d'un filtre CY3 (fluorescence rouge) et EGFP (fluorescence verte). Les conditions d'exposition ont été définies pour ne pas détecter d'auto fluorescence sur les cultures sauvages (WT) non fluorescentes. Les conditions étaient identiques pour toutes les images acquises avec le filtre CY3 (0.3 ms à 6dB) et le filtre EGFP (0.1ms à 6dB). Ces images ont été

prises avec un objectif permettant un grossissement de 10 fois avec la caméra QImaging et le logiciel d'acquisition Archimed (Microvision Instruments, France).

- Microscopie confocale

Toutes les images ont été réalisées avec un microscope confocal LSM 700 de ZEISS avec un objectif de grossissement 63 fois à immersion dans l'huile (Plan-Apochromat) avec une résolution de 512 X 512 pixels pour l'observation des cellules eucaryotes et 620 X 620 pour les mycoplasmes avec une ouverture de pinhole d'une unité d'aire. mNeonGreen a été excité avec le laser 488nm et toute la fluorescence émise jusqu'à 530nm a été récupérée. Hoechst a été excité avec un laser 405nm et une récupération de la fluorescence jusqu'à 490nm. L'Alexa Fluor® 594 a été excité avec le laser 590nm et une récupération de la fluorescence jusqu'à 490nm jusqu'à 630nm.

Les mycoplasmes seuls photographiés par microscopie confocale sont issus d'une culture de 3 jours lavée, et resuspendu dans 4% de paraformaldéhyde (PFA, Sigma-Aldrich, France) durant 15 minutes à température ambiante, puis, lavée deux fois avant d'être resuspendue dans 20 µL de milieu de montage ProLong Diamond antifade Mountant (Fisher scientific, USA) et, enfin, montée entre lame et lamelle.

Les cellules eucaryotes observées au microscope confocal sont cultivées en chambre de culture du système Labtek (Nunc, USA) pour faciliter l'analyse. Les cellules sont lavées avec du PBS chauffé à 37°C puis fixées durant 15 minutes à 37°C avec du PFA 4% avant un second lavage suivi d'un double marquage Hoescht à 2µM et l'Agglutinine de germe de blé (WGA Alexa Fluor® 594) à 5µM pendant 15 minutes à 37°C. La WGA se lie à l'acide sialique et aux résidus de *N*-acétylglucosaminy des cellules. Pour finir, les cellules ainsi marquées sont lavées et montées avec le milieu de montage entre la lame de la Labtek et une lamelle. Les lames doivent sécher 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière avant de pouvoir être observées.

Chapitre 1

Développement et validation d'un système d'expression par complémentation homologue

La pathogénie des maladies à mycoplasmes n'est à ce jour toujours pas entièrement caractérisée. Cette pathogénie dépend fortement des facteurs de virulence du mycoplasme mais aussi des interactions avec les cellules de leur hôte. Ainsi, pour mieux comprendre ces interactions souvent complexes, il est nécessaire de pouvoir les caractériser. Les outils conventionnels de manipulation génétique utilisés chez les bactéries ne sont pas adaptés aux mycoplasmes. En effet, les différences en termes de code génétique et sensibilité aux différents antibiotiques, ainsi que les spécificités des mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN et des systèmes de transcription et traduction ne permettent pas une utilisation universelle de ces outils. C'est dans cet objectif d'amélioration des connaissances sur les mycoplasmes qu'ont été développés divers outils moléculaires spécifiques résumés dans l'introduction de ce chapitre de thèse.

I Introduction

Ces dernières années, plusieurs avancées majeures ont été réalisées dans le développement d'outils génétiques pour la mutagenèse et/ou l'expression de gènes adaptés aux mycoplasmes. Parmi ces nouveaux outils développés ou améliorés on peut distinguer deux types de vecteurs : les vecteurs réplicatifs et les vecteurs basés sur l'utilisation d'une transposase. Ces derniers sont dérivés des transposons comme le Tn196, le premier à avoir été utilisé, ou le Tn4001 (d'origine staphylococcale), largement utilisé et qui a donné des

bons résultats. Ces différents outils permettent, la mutagénèse et/ou l'expression de gènes chez les *Mollicutes*. Les prochains paragraphes résument les différents outils moléculaires existants permettant la manipulation génétique des mycoplasmes révisés par Renaudin et collaborateurs (Renaudin et al., 2014).

I.1 Outils disponibles pour la manipulation moléculaire des mycoplasmes

- Plasmides réplicatifs utilisés chez les mycoplasmes :

La plupart des vecteurs génétiques utilisés chez les bactéries sont basés sur des éléments réplicatifs extrachromosomaux (Renaudin et al., 2014). De nombreux plasmides réplicatifs naturels ont été décrits chez les spiroplasmes (Breton et al., 2011) et les phytoplasmes (Firrao et al., 2007) mais très peu chez les mycoplasmes, à l'exception du groupe mycoides (Breton et al., 2012). Des vecteurs de clonage ont été développés à partir du plasmide pKMK1, (originaire de *Mmm* sérovar LC) et répliqués chez *Mmc* sérovar capri et *Mcc* (King and Dybvig, 1994). Plus récemment, des dérivés du plasmide pMyBK1 (originaire de *M. yeatsii*) ont été utilisés comme vecteurs d'expression hétérologue chez cette même espèce (Breton et al., 2012; Kent et al., 2012) mais aussi chez *Mcc* (Breton et al., 2012). En plus, ces derniers auteurs ont démontré que des dérivés de pMyBK1 pouvaient être répliqués chez trois autres espèces de mycoplasmes appartenant ou associés au groupe mycoides ; à savoir *Mcc*, *M. leachii* et *M. putrefaciens*. Par contre, ils n'ont pas réussi à transformer *Mmm* ni *S. citri* avec ces plasmides et les transformants obtenus chez *Mmc* ne contenaient non pas du plasmide libre mais inséré dans leur chromosome (Breton et al., 2012).

L'approche la plus efficace a été le développement de plasmides basés sur l'origine de réplication chromosomique « *oriC* » du mycoplasme, qui a été initié chez *S. citri* (Renaudin et al., 2014). Ces vecteurs navettes combinent la région *oriC* minimale de l'espèce en question permettant une réplication efficace (gène *dnaA* et séquences DnaA box) avec l'origine de réplication du plasmide *colE1* d'*E. coli* et le gène de la résistance à la tétracycline (*tetM*) sous contrôle du promoteur du gène de la spiraline de *S. citri*. Chez le genre

Mycoplasma, les plasmides *oriC* ont été pour la première fois construits pour *M. pulmonis* (Cordova et al., 2002). Depuis des plasmides *oriC* ont été développés pour *Mmm*, *Mmc* et *Mcc* chez le groupe mycoides (Lartigue et al., 2003). D'autres plasmides réplcatifs ont notamment aussi été développés chez *M. agalactiae* et *M. bovis* (Li et al., 2015; Sharma et al., 2015), *M. gallisepticum* (Lee et al., 2008), *M. imitans*, *M. synoviae* (Shahid et al., 2014) et *M. hyopneumoniae* (Maglennon et al., 2013a). Ces vecteurs ont été utilisés aussi bien pour l'expression de gènes que pour la mutation par recombinaison homologue.

La principale limitation à l'utilisation de ces outils est qu'il existe une spécificité d'espèce de la région *oriC* qui varie selon les espèces de mycoplasmes. L'efficacité de transformation varie significativement lorsque l'on transforme les mycoplasmes avec des plasmides *oriC*, homologues ou hétérologues (Lartigue et al., 2003). Lartigue et ses collaborateurs ont montré chez les mycoplasmes du groupe mycoides que l'utilisation d'un *oriC* homologue n'était pas indispensable pour toutes les espèces étudiées. Par exemple, *Mcc* peut être transformé avec des plasmides contenant l'*oriC* de *Mmm* ou *Mmc*, et ce, avec une bonne efficacité de transformation. Par contre, *Mmm* et *Mmc* ne peuvent pas réciproquement être transformés avec le plasmide réplcatif construit pour *Mcc*. De plus, chez *Mesoplasma florum*, qui est très proche phylogénétiquement du groupe *mycoides*, les plasmides contenant les *oriC* de ce groupe ne sont pas fonctionnels, alors que ce mycoplasme est très facilement transformable avec son *oriC* homologue (Matteau et al., 2017). Ces résultats révèlent que malgré la grande proximité génétique de ces espèces, les plasmides *oriC* ne sont pas entièrement universels au sein du groupe mycoides, et encore moins chez d'autres groupes plus éloignés phylogénétiquement. De ce fait, les systèmes réplcatifs basés sur les régions *oriC* sont loin de permettre une utilisation universelle des outils de mutagenèse ou d'expression génique chez les mycoplasmes.

- Plasmides basés sur l'utilisation d'une transposase :

Pour pallier au manque de vecteurs de clonage dans certaines espèces, notamment chez les mycoplasmes pathogènes de l'homme *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, des dérivés du transposon Tn4001 ont été utilisés pour la mutagenèse aléatoire par transposition, mais aussi pour l'expression de gènes (Renaudin et al., 2014).

Tn4001 est un transposon constitué de deux copies d'IS256 de part et d'autre du gène *aacA-aphD*, qui confère la résistance à la gentamycine, la kanamycine et la tobramycine (Byrne et al., 1989). Ce transposon a d'abord été utilisé pour l'obtention de mutants par transposition aléatoire chez *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Par la suite, cet outil a été utilisé chez *S. citri* (Renaudin et al., 2014). Il a ainsi permis l'identification de gènes impliqués dans la pathogénicité de ces *Mollicutes*. Plus tard, d'autres espèces telles que *M. agalactiae* et *M. bovis* (Baranowski et al., 2010; Chopra-Dewasthaly et al., 2005), *M. arthritidis* et *M. pulmonis* (Dybvig et al., 2000; French et al., 2008), *M. genitalium* (Glass et al., 2006; Hutchison et al., 1999), *Mmm* (Janis et al., 2008) et *M. hyopneumoniae* (Maglennon et al., 2013b) ont été transformées avec des dérivés du Tn4001 ou du Mariner pour le dernier.

Des transpositions secondaires pouvaient être observées dans les premières expériences qui utilisaient le transposon Tn4001 tel quel, sans modification (Renaudin et al., 2014). Pour éviter ces transpositions non désirées, et obtenir des insertions stables, des mini-transposons (aussi appelés plasposons) ont été développés dans lesquels le gène de la transposase est placé à l'extérieur des éléments transposables, ce qui empêche l'excision du transposon de son site primaire d'insertion (Renaudin et al., 2014; Zimmerman and Herrmann, 2005). De plus, une seconde amélioration a été apportée en combinant le plasposon pMT85 avec le système de recombinaison contenant le gène de la résolvasse TnpR du transposon $\gamma\delta$ et les séquences de reconnaissance « res » de cette résolvasse portés en *trans* par un plasmide réplcatif (Duret et al., 2005). Ce système amélioré permet donc, en plus, l'élimination du gène de résistance antibiotique chez les mutants (Renaudin et al., 2014). Il a été utilisé avec succès pour la production de mutants non marqués chez *Mmm* pour lesquels l'expression de la lipoprotéine majeure LppQ a été éteinte (Janis et al., 2008).

L'utilité de ces dérivés des transposons n'est pas limitée à la production de mutants par insertion mais ils permettent également l'expression de gènes, que ce soit pour la complémentation homologue de mutants ou pour l'expression hétérologue de gènes, chez diverses espèces de mycoplasmes. Prenons ainsi l'exemple de l'utilisation des dérivés du Tn4001 chez *M. pneumoniae* pour restaurer le phénotype cyto-adhérent chez des mutants déficients (Fisseha et al., 1999) ainsi que pour l'expression de gènes rapporteurs, tels que le

LacZ codant pour la β -galactosidase (Halbedel and Stülke, 2006) ou des marqueurs fluorescents (Kenri et al., 2004).

- Promoteurs utilisés pour l'expression de gènes chez les *Mollicutes* :

Plusieurs promoteurs des *Mollicutes* ont été caractérisés mais seulement quelques-uns ont été utilisés pour l'expression de gènes (Renaudin et al, 2014). Parmi ceux utilisés le plus communément, on retrouve le promoteur du gène *spiraline* de *S. citri*. Ce promoteur contrôle l'expression du gène de la protéine majoritaire de *S. citri*, la *spiraline*. Ceci suggère que le promoteur *spiraline* est un promoteur « fort » chez *S. citri*. Il a été utilisé pour l'expression de gènes hétérologues chez *S. citri*, permettant notamment l'expression d'une protéine membranaire du phytoplasme responsable de la flavescente dorée (Renaudin et al., 2015). Il a aussi été très largement utilisé pour contrôler l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques (*tetM*, *cat*, *aacA-aphD*), de gènes rapporteurs (tels que le *lacZ* et le gène de la GFP), du gène de la résolvasse *tnpR* (Duret et al., 2005) ainsi que du répresseur *TetR* (Breton et al., 2011) clonés dans des vecteurs développés pour *S. citri*, mais aussi dans des vecteurs développés pour d'autres espèces de *Mollicutes* (Renaudin et al 2014). Le promoteur *spiraline* a été utilisé chez des mycoplasmes tels que *Mcc*, pour l'expression de la β -galactosidase d'*E. coli* et de la *spiraline* de *S. citri* (Janis et al., 2005) et chez *M. yeatsii*, où il a permis l'expression de la protéine MALP-404 de *M. fermentas* (Kent et al., 2012). Ces mycoplasmes appartiennent au groupe phylogénétique « *Spiroplasma* ». Cependant, le promoteur *spiraline* a aussi été utilisé avec succès pour l'expression hétérologue de gènes chez d'autres mycoplasmes éloignés phylogénétiquement (Thompson et al., 2011) tels que *M. agalactiae* et *M. hyopneumoniae*, appartenant au groupe phylogénétique « *Hominis* » (Breton et al., 2010; Maglennon et al., 2013a) ou *M. gallisepticum*, *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, appartenant au groupe « *Pulmonis* » (Algire et al., 2009). D'autres promoteurs forts ont aussi été utilisés, mais uniquement chez l'espèce homologue. En effet, on peut citer par exemple l'utilisation du promoteur du gène de la P40, une protéine immunodominante chez *M. agalactiae* (Baranowski et al., 2010), le promoteur du gène de la protéine structurale p65 chez *M. pneumoniae*, ou le promoteur du gène du facteur d'élongation Tu (*tuf*) chez *M. mobile* et *M. pneumoniae*. Tous ces promoteurs ont été utilisés uniquement chez l'espèce homologue (Balish et al., 2003; Kenri et al., 2004; Tulum et al., 2014). Chez *M. pneumoniae* l'expression de gènes en fusion avec les protéines fluorescentes eYFP et eCFP a

été obtenue en utilisant le promoteur du gène *tuf* et celui de la P65 (Kenri et al., 2004). Dans ce modèle, le promoteur *tuf* donne les meilleurs résultats en termes d'expression protéique et d'intensité de fluorescence. De façon similaire, Tulum et ses collaborateurs ont utilisé avec succès le promoteur *tuf* pour contrôler l'expression du gène de la protéine P42 (*p42*) en fusion avec la eYFP chez *M. mobile* (Tulum et al., 2014). Dans les deux études citées ci-dessus les promoteurs *tuf* utilisés étaient les promoteurs homologues de l'espèce transformée. Il faut aussi noter que dans tous les exemples cités, les séquences correspondantes aux régions -35, -10 et au site de fixation du ribosome (RBS) n'ont pas été caractérisées et que ce que l'on entend comme « promoteur » ou « région promotrice » ici est en fait l'intégrité de la séquence intergénique précédant le codon d'initiation du gène en question, qui doit contenir les éléments nécessaires à sa transcription et traduction.

I.2 Objectifs

L'expression de protéines hétérologues par les mycoplasmes appartenant au groupe mycoides est un prérequis à l'obtention des objectifs de cette thèse. Pour cette raison nous devions d'abord développer et valider des outils d'expression adaptés à ces mycoplasmes, voire de manière plus large à d'autres *Mollicutes*, pour augmenter au maximum, dans la mesure du possible, leur champ d'utilisation.

Le premier objectif était de développer un système d'expression adapté au groupe mycoides basé sur la sélection d'un promoteur fort et d'un terminateur intrinsèque. Ce système pouvait être implémenté dans deux types de vecteurs différents, l'un réplcatif et l'autre basé sur l'utilisation d'un mini transposon, le vecteur de choix étant le plasmide comprenant le mini-transposon, qui s'intègre et serait beaucoup plus versatile, notamment à cause des spécificités d'*oriC*. Ensuite, l'efficacité des différentes constructions devait être évaluée.

Avant le début de ce travail de thèse, une construction portant le gène de la GFP2 sous contrôle du promoteur spiraline avait déjà été réalisée dans un plasmide réplcatif *oriC* de *Mmm* dans notre laboratoire. L'expression de fluorescence chez les mycoplasmes transformés avec cette construction (souches de *Mmc* et *Mmm*) était quasi nulle. Plusieurs raisons pouvaient expliquer ce manque d'activité comprenant, entre autre, une possible

toxicité de la protéine fluorescente ou une inadéquation de l'environnement du mycoplasme pour l'expression de la fluorescence. Pour ces raisons, nous tenions à valider le(s) nouveau(x) système(s) d'expression d'abord chez *Mmm* en évaluant le niveau d'expression d'un gène homologue conféré par ce(s) système(s) (complémentation d'un mutant). Le nouveau système devait permettre l'expression suffisante du gène de la manière la plus stable possible.

Les différentes stratégies mises en œuvre pour l'obtention de nouveaux outils d'expression de gènes pour des applications chez les mycoplasmes sont développées dans ce chapitre. Tout d'abord, le développement d'une cassette d'expression pour les mycoplasmes du groupe *mycoides*, basé sur la sélection d'un promoteur fort de *Mmm* et d'un terminateur universel. Viennent ensuite les stratégies de clonage de cette cassette dans deux types de vecteurs choisis (plasmide portant l'*oriC* de *Mmm* et plasposon), puis la validation des constructions disponibles dans le cadre d'une expression de gènes homologues.

II Résultats et discussion

II.1 Choix du système d'expression de gènes

- Choix de la cassette d'expression

Nous avons conçu une cassette d'expression de gènes pour le groupe *mycoides* constitué d'une séquence promotrice, d'un site multiple de clonage pour l'insertion de gènes et, enfin, d'un terminateur (**figure 13**). Chacun de ces éléments a été soigneusement choisi comme décrit ci-dessous.

Le promoteur du gène de la spiraline de *S. citri* a été utilisé avec succès pour contrôler l'expression de gènes chez diverses espèces de mycoplasmes éloignés phylogénétiquement des spiroplasmes (Renaudin et al., 2014). Il constitue, à notre connaissance, le seul promoteur dont l'efficacité a été démontré chez des modèles hétérologues et pouvait donc être un bon candidat pour le développement de systèmes d'expression de gènes « universels » chez les mycoplasmes. Par contre, les premières tentatives d'expression de la GFP2 sous contrôle du promoteur spiruline conduites au CIRAD n'avaient pas été satisfaisantes et nous voulions tester d'autres promoteurs forts adaptés au

groupe mycoides. Les systèmes d'expression développés par Kenri et Tulum chez *M. pneumoniae* et *M. mobile* respectivement ont permis l'expression de gènes en fusion avec une protéine fluorescente sous contrôle du promoteur du gène *tuf* homologue (Kenri et al., 2004; Tulum et al., 2014). Pour ces travaux de thèse nous avons choisi aussi le promoteur du gène *tuf*. Pour notre modèle, qui est tout d'abord le groupe mycoides, nous avons sélectionné le promoteur du gène *tufA* issu de *Mmm* (**figure 13**). En effet, toute la séquence en amont du gène *tufA*, à partir du précédent codon stop, y est comprise. Nous avons vérifié en amont que cette séquence était bien conservée au sein du groupe. Ainsi, l'alignement des séquences inter-géniques situées en amont du gène *tuf* des différentes souches représentatives des membres du groupe mycoides démontre une très forte homologie avec uniquement trois positions polymorphes (**annexe 4**). Par contre, lorsque l'on inclut des séquences provenant d'espèces de mycoplasmes plus éloignés la divergence est très importante et on ne retrouve pratiquement pas d'homologie entre elles.

La séquence « promotrice » du gène *tufA* comporte les régions nécessaires à la transcription et à la traduction, qui n'ont pas été caractérisées fonctionnellement. Cependant, une analyse visuelle des séquences permet de constater la présence de motifs putatifs, annotés dans la **figure 13** : le motif « AGGAG » caractéristique du RBS (situé 8 nucléotides en amont du codon d'initiation), le motif canonique de la boîte -10 ou Pribnow « TATAAT », parfaitement conservé, et le motif « TTGAA » dégénéré correspondant à la boîte -35, dont le motif canonique est « TTGACA » (Lloréns-Rico et al., 2015). Les séquences entre les boîtes -10 et -35 (« spacer » de 24 nucléotides) et en amont de la boîte -35 sont caractérisés par un très faible taux de GC, avec présence de polyA ou polyT. Le fait que les séquences de la région -10, et aussi en partie de la région -35, ressemblent aux séquences consensuelles des promoteurs bactériens reconnues par l'ARN polymérase est indicatif d'un promoteur fort et versatile. Il est probable alors que le promoteur du gène *tufA* soit largement fonctionnel chez les mycoplasmes, où la boîte Pribnow est assez conservée, tandis que la boîte -35 l'est beaucoup moins (Lloréns-Rico et al., 2015).

A la suite de la séquence promotrice nous avons conservé les 11 premiers acides aminés du gène *tufA* de Rita (**figure 13**). Cette construction permet, suivant le modèle développé chez *M. pneumoniae* et *M. mobile* (Kenri et al., 2004; Tulum et al., 2014), l'expression des gènes clonés en fusion avec le début du gène *tufA*, évitant ainsi un décalage

entre le promoteur et RBS et le codon d'initiation AUG. Ces quelques acides aminés supplémentaires n'ont pas empêché l'adressage à la membrane des protéines de surface dans le modèle *M. mobile* (Tulum et al., 2014).

Nous avons sélectionné le terminateur du gène de la fibrille (*fib*) de *S. citri*. Il permet un détachement du ribosome et un arrêt de la traduction grâce à la structure secondaire en tige boucle de son ARN messenger (**figure 13**). L'ajout d'un terminateur permet d'éviter une éventuelle traduction forcée par le ribosome, qui ignorerait le codon stop, et ainsi d'optimiser le processus de traduction.

Séquences utilisées pour la cassette d'expression de gènes 5'-3'	
Promoteur <i>tufA</i> + 33 nucléotides du gène <i>tufA</i> (rouge) de <i>Mmm</i> souche PG1	TATTTT TTGAATT AAGTATTAAATAAGTGTA ⁻³⁵ AAAATATATAATA motif -10 GTAAAAACGCCCCAAAAGGGGCAGACAAAATAGTAGAAA TATATCTATTATTCTTGATTGTATAGAAATTTTTA AGGAGAA motif RBS AAAAAC ATGGCAAAGAACAATTTGACCGTAGTTTACCT
Terminateur <i>fib</i> de <i>S. citri</i> Hairpin en bleu	AAATTAAAGTTGGTTCATTCAAAGTTACAATTCGTTTAAAA AGTGAATAATTAATTATTAATTAATTTATT AAAAAACAACCA AAAGGTTGTTTTT ATTTTTTAAA 
Site de clonage multiple (MCS)	CCATGG AAAAGTCGACC GCGGCTTAAG <i>NcoI</i> <i>Sall</i> <i>SacII</i> <i>AflIII</i>

Figure 13 : Séquences promotrice, terminatrice et site de clonage multiple utilisées dans la cassette pour l'expression de gènes chez les mycoplasmes.

Promoteur : Séquence comprenant le RBS (site de reconnaissance du ribosome sur l'ARNm) et promoteur du gène *tufA* de *Mmm* suivie des 33 pb du début du gène *tufA* (en rouge).

Terminateur : La région en bleu indique la séquence formant une structure secondaire en tige boucle de l'ARNm qui a pour effet de stopper la traduction par décrochement du ribosome.

Les sites de reconnaissance des enzymes de restriction *NcoI*, *Sall*, *SacII* et *AflII* (**figure 13**), qui étaient absents du plasposon et des plasmides *oriC*, ont été choisis pour le site multiple de clonage car ils sont compatibles avec le clonage de gènes dans les deux types de vecteurs. Ces sites ont aussi été sélectionnés pour l'inter-compatibilité des enzymes

associées (possibilité de digestions multiples). Toutes les enzymes utilisées génèrent, par ailleurs, des extrémités cohésives, ce qui facilite la ligation et l'orientation des gènes lors du clonage.

- Choix du vecteur de clonage :

Les premières tentatives conduites au laboratoire pour l'expression de la GFP2 chez *M. mycoides* avaient été basées sur l'utilisation du plasmide pCC1 (Béven et al., 2012), (**figure 12**), un plasmide réplcatif développé par l'INRA de Bordeaux pour l'expression de gènes chez *M. mycoides* (*oriC Mmm*). Ce plasmide contient le promoteur *spiraline* en amont d'un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *XhoI* pour permettre le clonage de gènes à la suite du promoteur. Ce vecteur constituait ainsi le choix le plus simple, car aucun développement n'était nécessaire avant le clonage de gènes. Pour nos travaux de thèse, par contre, nous avons choisi de développer le nouveau système d'expression décrit précédemment, qui devait ensuite être cloné dans un vecteur approprié, qu'il soit réplcatif ou basé sur l'utilisation du mini-transposon.

L'utilisation de plasmides réplcatifs *oriC* pour le clonage de gènes chez les mycoplasmes pose plusieurs contraintes. Tout d'abord, l'origine de réplcation *oriC* est assez spécifique d'espèce (Lartigue et al., 2003). Malgré une certaine compatibilité d'*oriC* démontrée à l'intérieur du groupe *mycoides*, les vecteurs *oriC* ne peuvent pas être utilisés de manière universelle chez les mycoplasmes, y compris au sein de ce groupe, ce qui restreint leur champ d'utilisation. De plus, l'utilisation d'un marqueur de sélection antibiotique est indispensable pour leur maintien dans la cellule, ce qui en fait un outil mal adapté aux études *in vivo*. Par contre, un avantage non négligeable de ce système réplcatif est la présence de plusieurs plasmides au sein d'un même mycoplasme et donc de plusieurs copies du gène. Ce système peut être très intéressant pour maximiser l'expression de gènes.

L'utilisation du plasposon pMT85/2res dérivé du Tn4001 (Janis et al., 2008, **figure 9**) comme vecteur de clonage aurait plusieurs avantages. Ce plasposon confère une forte versatilité à l'outil d'expression de gènes chez les mycoplasmes et permet de s'affranchir d'une pression de sélection antibiotique grâce à l'insertion stable de la construction au sein du génome bactérien. De plus, l'utilisation d'un second plasmide portant une résolvase donne la possibilité d'enlever le gène de résistance antibiotique chez des mutants d'intérêt

(Janis et al., 2008). Ce plasposon est donc un outil de choix pour les études *in vivo* ou pour faire des transformations successives.

Au cours de cette thèse, la stratégie d'insertion de gènes hétérologues dans le plasposon pMT85/2res a donc été privilégiée. Ce plasmide a été généreusement fourni par l'INRA de Bordeaux comme outil de mutagénèse aléatoire. Il permet l'insertion aléatoire mais stable d'un gène de résistance à la kanamycine dans le génome des mycoplasmes (**figure 9**). L'inconvénient principal du plasposon est qu'il n'est pas prévu pour l'expression de gènes et doit être modifié pour le clonage. Par ailleurs, une seule copie du gène est insérée dans le génome. De ce fait, si l'on veut augmenter le nombre de copies du gène à exprimer, il faut réutiliser le système pour insérer plusieurs copies, ce qui est assez chronophage et peut être associé à une importante dérive génétique due aux multiples passages *in vitro*. C'est pourquoi, et malgré tous les inconvénients cités plus en amont, une stratégie de clonage de la cassette d'expression dans le plasmide *oriC* de *Mmm* pMYSO1 a été établie et réalisée en parallèle (**figure 11**). Le plasmide pCC1 (**figure 12**) a lui aussi été retenu dans l'objectif d'évaluer l'efficacité du promoteur *tufA* par rapport au promoteur spiruline, très largement utilisé pour l'expression de gènes chez les mycoplasmes (Renaudin et al., 2014). Le choix de plasmides portant l'*oriC* de *Mmm* confère une certaine flexibilité pour utilisation au sein du groupe mycoïdes car il a été démontré que *Mcc* peut être transformé avec des plasmides contenant l'*oriC* de *Mmm* ou *Mmc*, tandis que l'inverse n'est pas vrai pour *Mmm* et *Mmc* (Lartigue et al., 2003).

Que ce soit pour l'utilisation du pMT85/2res ou des plasmides réplicatifs pCC1 et pMYSO1, les constructions devaient d'abord être faites chez *E. coli*, en insérant le gène d'intérêt dans le vecteur d'expression, avant de transformer les mycoplasmes.

II.2 Développement de systèmes d'expression de gènes

- Système utilisant le plasposon pMT85/2res

Au sein du plasposon les régions entre les séquences inversées répétées IR et les séquences *res* étaient les seules dans lesquelles la cassette pouvait être insérée si l'on tenait à préserver le système de résolution pour obtenir des mutants non marqués. Il était seulement possible de cloner la cassette dans les 20 pb entre IR-1 et *res1* (**figure 7 et 9**).

L'analyse des sites de restriction au niveau de cette séquence d'ADN montrait la présence du site de restriction de l'enzyme *SpeI*.

Une cassette d'expression comprenant le site *SpeI*, le promoteur *tufA* de *Mmm* (Ptuf), un site multiple de clonage (MCS) avec les sites de reconnaissance des enzymes de restriction *NcoI*, *Sall*, *SacII* et *AflII*, puis le terminateur *fib* de *S. citri* (Tfib) et une extrémité *XbaI* (compatible avec *SpeI*) a été développée pour clonage dans le plasposon (**figure 14**).

Cette cassette a été obtenue par plusieurs PCR successives avec queues flottantes, suivies d'une « overlap » PCR comme indiquée dans la **figure 14**.

La première PCR a permis d'obtenir un fragment contenant le promoteur *tufA* à partir du génome de la souche Rita de *Mmm* avec les amorces *SpeI_Ptuf_F* et *NcoI_Ptuf+_R* (**table 3**), possédant des queues flottantes qui contiennent les sites de restriction.

Une seconde PCR a été réalisée pour amplifier le fragment contenant le terminateur *fib* de *S. citri* à partir du plasmide pPS3.1 (**figure 10**), développé par l'INRA de Bordeaux. Les amorces *MCS_Ptuf+_Tfib_F* et *Tfib_XbaI_R* (**table 3**) utilisées ici ont aussi des queues flottantes avec les sites de restriction souhaités.

La troisième PCR est une amplification qui utilise la stratégie « overlap ». Le milieu réactionnel de cette PCR est différent des conditions classiques car il est composé de chacun des deux produits purifiés des PCR précédentes comme ADN matriciel et il n'y a pas d'amorces. Douze cycles de PCR sont réalisés afin de synthétiser les bases manquantes pour assembler les produits des deux précédentes PCR.

La quatrième PCR est réalisée avec le couple d'amorces *SpeI_Ptuf_F* et *Tfib_XbaI_R* (**Table 3**), en utilisant le produit purifié de la PCR précédente comme matrice, pour l'amplification du produit final contenant la cassette d'expression et des extrémités cohésives compatibles *SpeI* et *XbaI*.

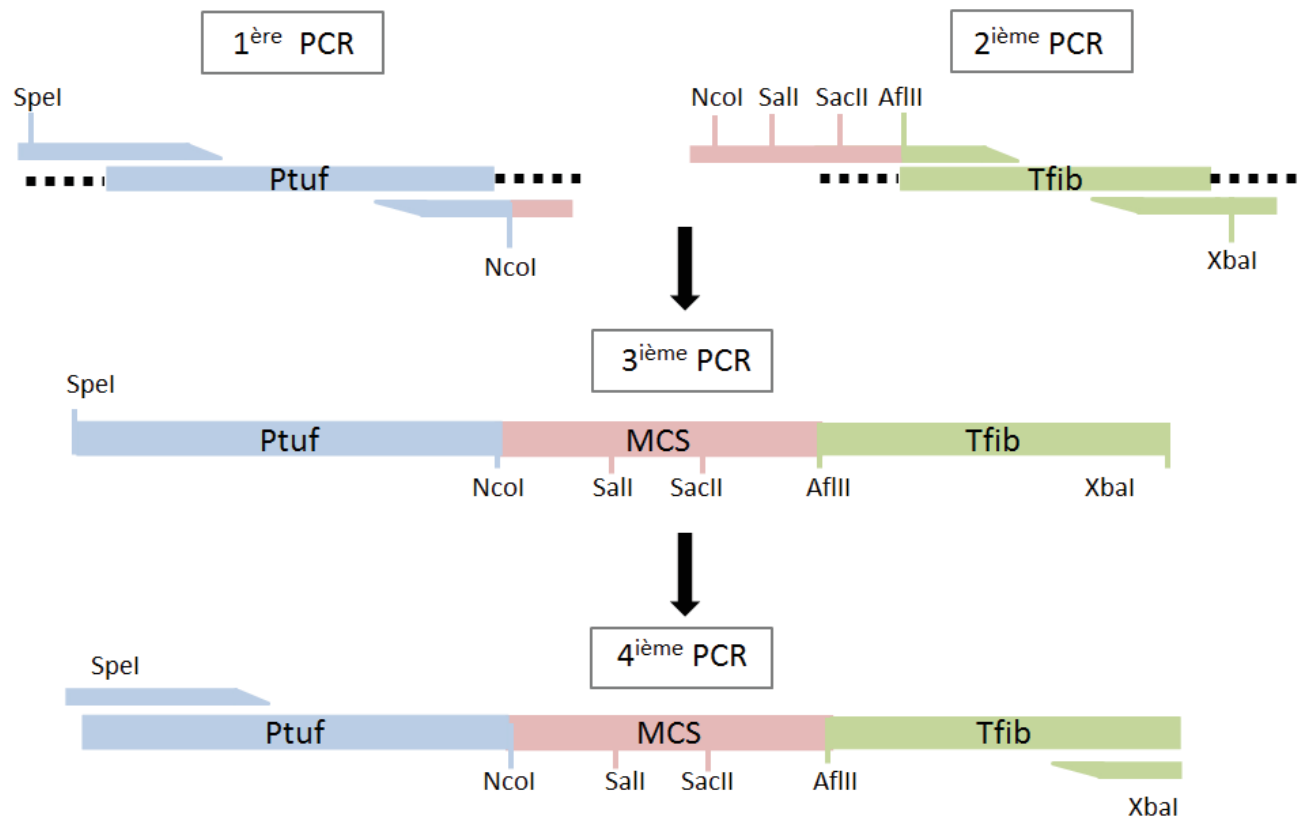


Figure 14 : « Overlap » PCR pour l'obtention de la cassette Ptuf-site de clonage multiple-Tfib.

La première PCR permet d'amplifier le promoteur du gène *tuf* (Ptuf). La seconde PCR permet d'amplifier le terminateur du gène de la fibrille (Tfib). La troisième PCR (overlap) n'utilise pas d'amorce, mais consiste à synthétiser les bases manquantes entre les deux queues flottantes des produits des PCR 1 et 2. La quatrième PCR permet d'amplifier le produit final.

Cette cassette d'expression a ensuite été digérée par *SpeI* et *XbaI*, puis clonée dans le plasposon pMT85/2res digéré par *SpeI* (**figure 15**). Ce clonage a permis l'obtention du pMT85/2res modifié pour l'expression de gènes, renommé pMT/exp.

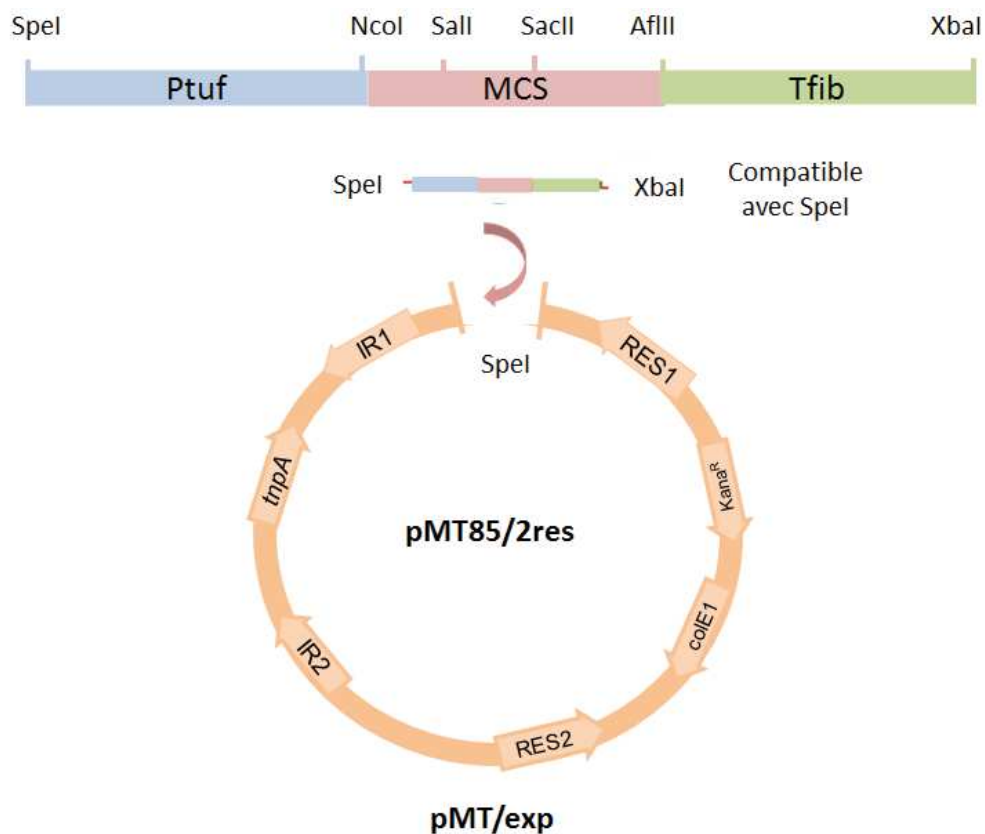


Figure 15 : Obtention du vecteur d'expression pMT/exp par clonage dans le pMT85/2res de la cassette comprenant le promoteur du gène *tufA* de *Mmm* (Ptuf), le site multiple de clonage (MCS) et le terminateur du gène *fib* de *S. citri* (Tfib). Le MCS permet le clonage directionnel de gènes à la suite du promoteur et en amont du terminateur.

- Système utilisant le plasmide répliquatif pMYSO1

La cassette d'expression intégrée dans le pMT85/2res devait ensuite être clonée dans le plasmide répliquatif pMYSO1, afin de pouvoir comparer l'efficacité du système d'expression dans les deux types de vecteurs.

Pour cela, il fallait effectuer une modification mineure. En effet, les sites de restriction aux extrémités de la cassette devaient être différents pour permettre le clonage dans ce plasmide. Nous avons donc dû amplifier par PCR la cassette d'expression en utilisant des queues flottantes comportant les sites de reconnaissance des enzymes *SapI* pour l'amorce sens *SapI_Ptuf_F* et *SphI* pour l'anti-sens *SphI_Tfib_R* (**table 3**). La réalisation de cette PCR permet d'obtenir une cassette d'expression pouvant être cloné dans le vecteur pMYSO1 (**figure 16**).

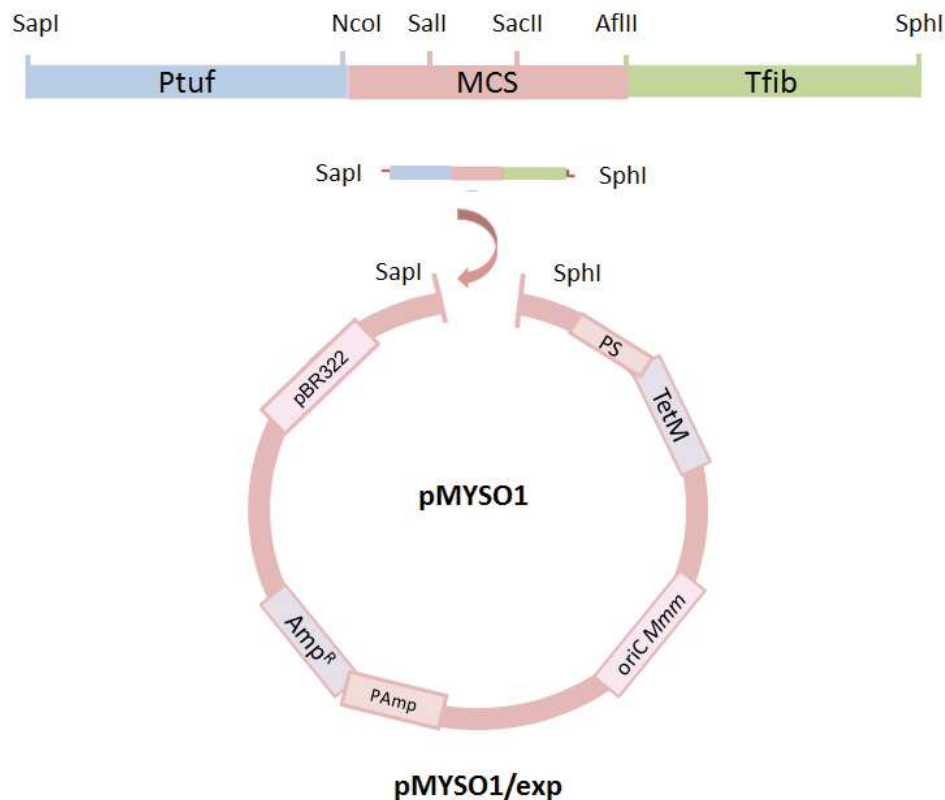


Figure 16 : Stratégie de clonage de la cassette d'expression dans le vecteur réplcatif optimisé pour *Mmm*. L'insertion doit avoir lieu entre les sites de reconnaissance aux enzymes de restriction *SapI* et *SphI*.

Le développement de la construction dans le pMYSO1 n'a pas abouti malgré de nombreux essais pour intégrer la cassette d'expression entre les sites de reconnaissance aux enzymes de restriction *SapI* et *SphI* qui se situent dans une région non codante du plasmide.

Nous avons séquencé à nouveau le plasmide dans son ensemble pour vérifier qu'il n'y ait pas eu de problème au niveau des sites de reconnaissance aux enzymes de restriction. Aucune anomalie n'a été détectée au séquençage. Le développement d'un système d'expression de gènes dans le plasmide réplcatif pMYSO1 de *Mmm* a été alors suspendu en attendant les résultats de validation du système développé dans le plasposon.

II.3 Validation des systèmes d'expression par complémentation homologue

Afin de mettre en place chez les mycoplasmes et, plus particulièrement chez les représentants du groupe mycoides, un système pour l'expression de gènes hétérologues, nous avons voulu étudier en premier lieu l'expression de gènes homologues pour éliminer toutes les variables dépendantes du gène hétérologue (possible toxicité ou inadaptation chez le mycoplasme). Cette vérification nous permettra de valider le système en amont, au moins dans notre modèle d'étude *Mmm*, pour éviter de ne pas savoir d'où vient le problème dans le cas d'une non expression de gène hétérologue, comme cela avait été le cas pour la GFP2.

Pour ce faire, nous avons choisi d'évaluer l'efficacité de notre système d'expression en mesurant le niveau de complémentation chez un mutant de *Mmm*. Le mutant utilisé (appelé Rita ΔK^-) est un dérivé de la souche virulente Rita de *Mmm*. Ce mutant, a été sélectionné à partir d'une banque de mutants générée à l'aide de l'outil de mutagenèse aléatoire pMT85/2res. L'insertion du plasposon au milieu du gène d'une lipoprotéine immunodominante (appelée Lpp pour des raisons de confidentialité), a eu pour conséquence l'obtention d'une souche mutante n'exprimant plus la lipoprotéine en question. Ce mutant a été rendu à nouveau sensible à la kanamycine grâce à l'action de la résolvasse du plasmide pCJ15 (**figure 8**) pour permettre à nouveau l'utilisation du pMT/exp pour l'expression de gènes.

- Construction pour expression de la lipoprotéine dans le pMT/exp

La lipoprotéine Lpp de *Mmm* a été clonée dans le pMT/exp. Pour ce faire, le gène de la lipoprotéine en question a été amplifié à partir de la souche Rita de *Mmm*, avec le couple d'amorces NcoI_Lpp_F et AfIII_Lpp_R (**table 3**). Ces amorces possèdent les sites de restriction (NcoI en 5' et AfIII en 3') nécessaires pour l'insertion dans le pMT/exp. Le produit de PCR Lpp ainsi obtenu a été purifié et digéré avec NcoI et AfIII. Le pMT/exp a lui aussi été digéré avec ces mêmes enzymes pour permettre le clonage directionnel du gène de la Lpp. *E. coli* a été transformée avec cette construction, et les colonies de transformants ont été criblées par PCR avec les amorces utilisées précédemment pour l'amplification du gène.

Le rendement pour ce clonage a été de 15% des clones portant le plasmide complet. Ces constructions ont été vérifiées par séquençage avec les amorces pMT85-Spelcloning_F et MT85_F. Le plasposon portant le gène de la lipoprotéine a été appelé pMT/Lpp (**figure 17**).

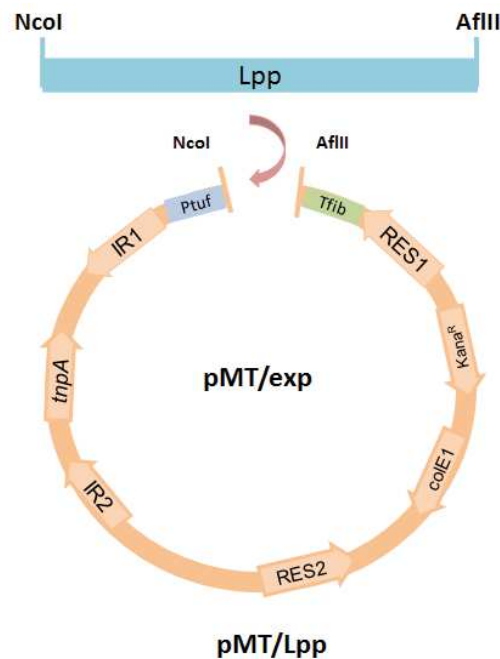


Figure 17 : clonage de la lipoprotéine Lpp de *Mmm* dans le pMT/exp pour l'obtention du pMT/Lpp.

- Construction pour expression de la lipoprotéine dans le pCC1

Après l'échec du clonage de la cassette d'expression de gènes dans le pMYSO1, il nous restait encore à tester le plasmide réplcatif pCC1 avec *oriC Mmm*, qui permet l'expression de gènes sous contrôle du promoteur spiruline. Nous avons voulu valider cet outil pour avoir deux vecteurs différents permettant l'expression de gènes afin de comparer leur efficacité respective. Pour cela nous avons besoin de cloner la séquence de la lipoprotéine à la suite du promoteur spiruline en utilisant le site unique *XhoI* disponible dans ce vecteur. La stratégie de clonage est présentée en **figure 18**. Cette fois-ci nous avons amplifié par PCR le gène de la lipoprotéine à partir du génome de la souche Rita de *Mmm* avec les amorces *XhoI_Lpp_F* et *XhoI_Lpp_R* (**table 3**).

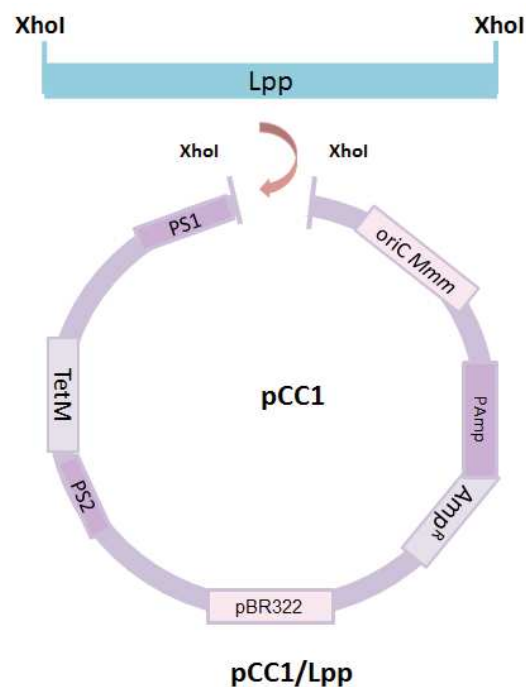


Figure 18 : Stratégie de clonage de la lipoprotéine Lpp de *Mmm* dans le plasmide réplcatif pCC1 prévu pour le clonage et l'expression de gènes chez *Mmm*

Cette stratégie de clonage s'est elle-aussi soldée par un échec. En effet, le clonage avec un seul site de restriction est plus complexe car il est nécessaire de déphosphoryler le plasmide pour éviter sa re-circularisation sans intégration d'insert, ce qui réduit énormément les chances l'efficacité de la ligation. En plus, cette technique ne permet pas l'orientation des insertions. Aussi, nous avons séquencé entièrement le plasmide mais il n'y avait aucun problème de séquence, notamment au niveau du site *XhoI*. Nous avons abandonné cette stratégie en considérant que les difficultés de clonage seraient un frein à l'avancement de ces travaux de thèse, où diverses constructions devaient être produites.

Malgré ce second échec sur plasmide réplcatif, nous avons quand même réussi à développer un système d'expression dans le plasposon pMT85/2res. Ce vecteur était notre premier choix, car il possède de nombreux avantages par rapport aux plasmides réplcatifs, permettant notamment de s'affranchir des limitations dues à la spécificité d'*oriC*. Il fallait absolument évaluer l'efficacité du pMT/exp pour valider notre choix de système d'expression pour ce travail de thèse.

- Validation du système d'expression pMT/exp par complémentation homologue

La souche mutante Rita ΔK -, déficiente pour la lipoprotéine Lpp, a été transformée avec le vecteur pMT/Lpp dans le but de restaurer l'expression de la lipoprotéine.

Après cette transformation, le titre de Rita ΔK - sans antibiotiques a été estimé à $4,4 \times 10^8$ UFC/mL et le titre de Rita ΔK - avec kanamycine a été estimé à $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. L'efficacité de transformation calculée est de $5,7 \cdot 10^{-6}$ UFC de transformants/UFC totales. La faiblesse de ces ratios comparée à l'efficacité de transformation habituelle avec le pMT85/2res dans notre laboratoire (environ 10^{-5} UFC de transformants/UFC totales) peut être expliquée par le fait que le plasposon pMT/Lpp contenant la cassette pour l'expression de la lipoprotéine est plus gros que le plasmide d'origine pMT85/2res (plus d'1 kpb en plus). Il est donc plus difficile pour *Mmm* d'intégrer le plasposon modifié.

Une PCR utilisant le couple d'amorces NcoI-Lpp-F et AflIII-Lpp-R (**table 3**), amplifiant la lipoprotéine, a été réalisée sur 20 transformants isolés et ils possédaient tous le gène d'intérêt, confirmant ainsi l'intégration du plasmide pMT/Lpp-0431 dans le génome de Rita ΔK -. Avant d'étudier le niveau de complémentation protéique nous avons vérifié l'intégrité de la séquence par séquençage du produit PCR obtenu avec les amorces pMT85-spelcloningF et MT85_F à partir d'ADN extrait de la souche complémentée. Aucune modification dans la séquence de la cassette d'expression et du gène codant pour la Lpp n'a été observée lors du séquençage.

Un western blot a été réalisé pour vérifier l'expression de la lipoprotéine chez le mutant Rita ΔK - complémenté avec le pMT/Lpp. Les protéines totales ont été extraites à partir de 10 mL de culture des souches Rita sauvage (WT), Rita ΔK -, et 5 clones transformants de la souche Rita ΔK - complémentée. Un SDS page a été effectué avec les différentes préparations de protéines (les résultats pour l'un de 5 clones testés, représentatif des autres clones sont présentés en **figure 19**). Le Western Blot révélé avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la Lpp montre que la souche sauvage Rita exprime fortement la lipoprotéine, alors que la souche Rita ΔK - ne l'exprime pas. Les transformants Rita ΔK - complémentés expriment bien la lipoprotéine, ce qui confirme qu'un gène homologue inséré par le système pMT/exp peut être exprimé.

L'intensité de la bande correspondant à l'expression de la lipoprotéine est inférieure chez la souche Rita ΔK - complémentée que chez la souche sauvage Rita. Cela correspond à une différence en quantité de protéines, la souche sauvage Rita exprimant plus la lipoprotéine que les mutants complémentés. La complémentation ne permet donc pas d'obtenir une expression de la Lpp chez les transformants égale à celle de la souche sauvage. Ici le niveau de complémentation peut être estimé à, au moins, 25% (**figure 19**). Le Western Blot dans ces conditions ne permet pas la quantification précise des protéines. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser une autre méthode.

La quantification de l'expression de la Lpp devait être réalisée par cytométrie en flux. Les anticorps monoclonaux spécifiques de la Lpp utilisés lors du Western Blot se sont avérés inefficaces en cytométrie en flux et n'ont malheureusement pas permis l'utilisation de cette méthode de quantification (résultats non montrés). Ces anticorps monoclonaux reconnaissent certainement un épitope linéaire qui ne doit être accessible qu'en condition dénaturante, comme lors de la réalisation du SDS page.

Nous avons considéré que le niveau de complémentation homologue obtenu avec notre système d'expression était très satisfaisant, même s'il ne nous a pas permis de restaurer le niveau d'expression de la Lpp de la souche sauvage. Lors de la complémentation de mutants il est tout à fait habituel que le phénotype sauvage soit uniquement partiellement restauré (Béven et al., 2012; Waldo et al., 2005). Le système d'expression pMT/exp ainsi validé, nous avons abandonné définitivement le développement de systèmes d'expression basés sur plasmide oriC. La suite du travail va donc reposer exclusivement sur le système de transposon pMT/exp.

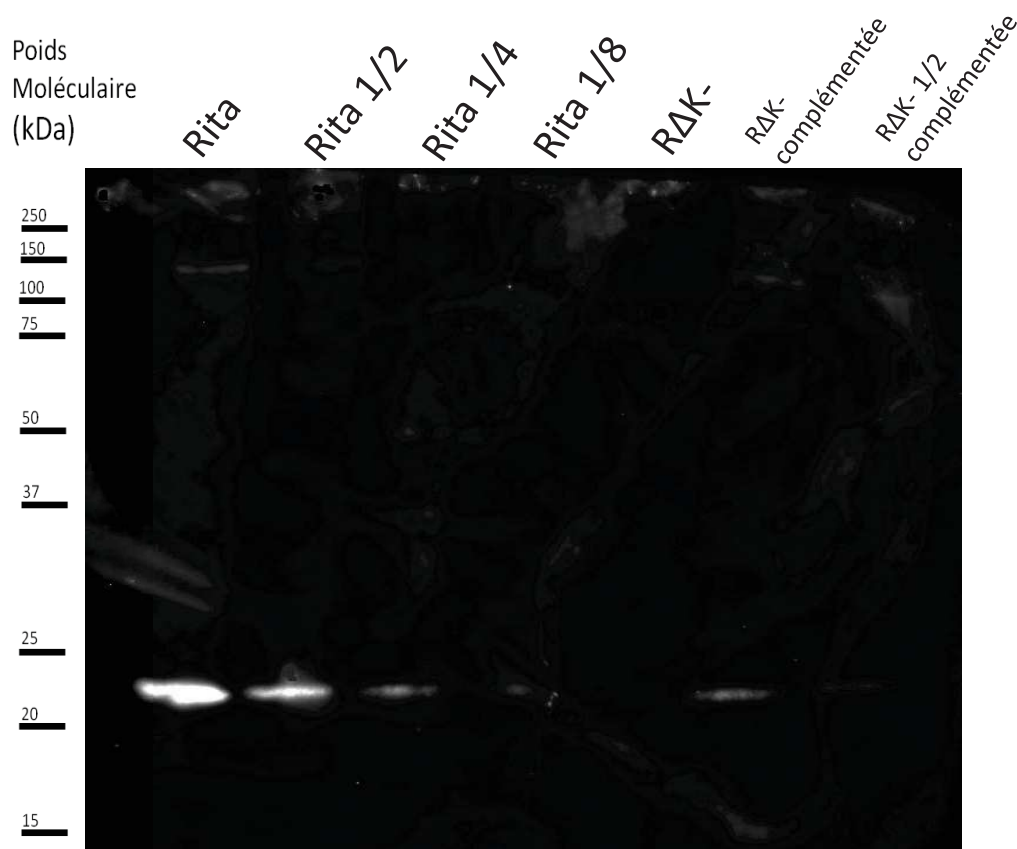


Figure 19 : Western Blot des protéines des souches Rita, Rita RΔK-et RΔK- complémenté avec le système pMT/Lpp à différentes dilutions. Révélation avec un anticorps monoclonal dirigé contre la Lpp.

III Conclusions et perspectives

L'objectif de ce chapitre de thèse était de développer un système pour l'expression de gènes chez les mycoplasmes du groupe mycoides qui soit efficace mais, aussi, le plus universel possible pour maximiser son champ d'utilisation.

Nous avons d'abord conçu un système d'expression consistant en «promoteur fort - site de clonage multiple – terminateur intrinsèque». Deux stratégies de clonage ont été initialement prévues : la première utilisait un plasposon, permettant l'intégration stable de gènes clonés dans le chromosome des mycoplasmes; la seconde un plasmide réplcatif portant l'*oriC* de *Mmm*. Une cassette permettant l'expression de gènes sous le contrôle du promoteur *tufA* de *Mmm* a été obtenue et intégrée dans le plasposon. La même construction dans le plasmide réplcatif de *Mmm* n'a pas abouti. L'évaluation de l'efficacité de ce système d'expression dans le modèle *Mmm* reposait sur la quantification du niveau de

complémentation homologue d'un mutant de *Mmm* n'exprimant pas une lipoprotéine. Le système d'expression a permis de restaurer au moins 25% de l'expression de la lipoprotéine chez le mutant par rapport à la souche sauvage, ce qui nous a permis de valider l'outil d'expression, appelé pMT/exp.

Cet outil présente de nombreux avantages conférés par le vecteur de clonage pMT85/2res. Il permet l'insertion stable des gènes à exprimer dans le chromosome du mycoplasme, avec l'option d'éliminer le marqueur de sélection antibiotique (Janis et al., 2008) et ceci avec un champ d'utilisation large chez les *Mollicutes* (Renaudin et al., 2014). De plus, même si l'efficacité de transformation du plasposon après insertion de gènes est inférieure à celle du pMT82/2res d'origine, le nombre de clones obtenus, plusieurs centaines par tube de transformation, selon la méthode utilisée ici est encore largement suffisant pour permettre la sélection de mutants, voire pour produire des banques de mutants.

En ce qui concerne le système d'expression *per se*, nous avons choisi le promoteur du gène *tufA* issu de la souche type PG1 de *Mmm*. En raison de l'homologie des séquences entre les différents membres du groupe mycoides (Manoso-Silván et al., 2007) ce système devrait pouvoir être applicable chez tous les membres de ce groupe. De plus, certains promoteurs peuvent être utilises chez des espèces autres que celles dont ils sont originaires. C'est le cas du promoteur fort du gène de la spiruline de *S. citri*, qui a été utilise avec succès chez des espèces éloignées phylogénétiquement, tels que *M. agalactiae* et *M. hyopneumoniae* (Breton et al., 2010; Maglennon et al., 2013a). Il serait alors intéressant de vérifier si notre système fonctionne chez des espèces éloignées du groupe mycoides pouvant être transformes avec le plasposon.

En conclusion, nous avons developpe et valide un système pour l'expression de gènes chez le groupe mycoides mais qui pourrait être applicable chez d'autres espèces de mycoplasmes. Nous pouvons donc poursuivre les objectifs de cette thèse, notamment en exploitant cet outil pour l'expression de marqueurs fluorescents. L'obtention de mycoplasmes marques serait intéressante non seulement pour le suivi des interactions avec les cellules de l'hôte, comme evoque dans l'introduction de cette thèse, mais aussi pour l'utilisation comme modèle pour évaluer la versatilité du système d'expression. En effet, l'analyse du niveau d'expression d'un gène rapporteur confere par le pMT/exp peut être

utilisée pour évaluer son efficacité chez différentes espèces de mycoplasmes plus ou moins éloignés. Il serait donc intéressant de tester le système développé au cours de ce travail chez une autre espèce comme *M. bovis*, qui fait partie du groupe phylogénétique Hominis, éloigné du groupe mycoides (Sirand-Pugnet et al., 2007).

Chapitre 2

Expression hétérologue de marqueurs fluorescents chez *Mmm* et *M. bovis* et validation pour l'étude des interactions avec les cellules de l'hôte

I Introduction

I.1 Expression hétérologue de protéines fluorescentes chez les mycoplasmes

Les exemples d'expression hétérologue de marqueurs fluorescents chez les mycoplasmes dans la littérature sont très exceptionnels et rarement satisfaisants.

Ainsi, le gène de la GFP en fusion avec celui de la spiruline, a été inséré dans le génome de *S. citri* par recombinaison homologue. Pourtant, aucun des mutants obtenus ne présentaient de fluorescence détectable et, de plus, la recombinaison ne se faisait pas toujours correctement, ce qui invalidait la protéine endogène sans permettre l'expression de la protéine fluorescente (Duret et al., 2003).

D'autres auteurs ont fait exprimer l'eGFP chez *M. pneumoniae* en utilisant un système de transposition aléatoire dérivé du transposon *Tn4001* (Balish et al., 2003). L'expression de fluorescence a permis de localiser une protéine mais a eu un effet néfaste sur la biologie du mycoplasme en modifiant sa morphologie. Un autre travail réalisé aussi chez *M. pneumoniae* a utilisé les protéines fluorescentes eCFP (émettant dans le bleu) et eYFP (émettant dans le jaune) en fusion avec des protéines structurales du mycoplasme afin de les localiser (Kenri et al., 2004). Ici aussi, le système d'expression était basé sur l'utilisation d'un transposon modifié. Zimmerman et Herrman ont utilisé un système similaire avec le gène de la protéine fluorescente mRFP1 (monomérique avec une émission dans le rouge) en fusion avec un gène hypothétique pour vérifier qu'il était bien codant et qu'un peptide était traduit (Zimmerman and Herrmann, 2005). Plus récemment Tulum et ses collaborateurs ont exprimé avec succès l'eYFP en fusion avec deux protéines chez *M. mobile*

(Tulum et al., 2014). Plusieurs modifications ont été apportées à ces modèles par rapport à la première étude de Duret et ses collaborateurs (Duret et al., 2003). En effet, l'utilisation de transposon à la place de systèmes de recombinaison homologue rend la transformation plus aisée. De plus, ici l'eYFP a été optimisée suivant l'usage préférentiel des codons par les mycoplasmes. Ces travaux ont permis de localiser les protéines grâce à l'expression de l'eYFP. Cependant, la fluorescence restait d'une intensité faible.

Un travail plus récent qui n'utilise pas de transposon a permis l'expression de la YFP optimisée selon le code génétique des mycoplasmes chez *Spiroplasma eriocheiris* (Terahara et al., 2017). Dans cette étude les auteurs ont développé un plasmide réplcatif avec un *oriC* spécifique dans lequel l'expression du gène de fluorescence couplé à une protéine endogène est contrôlée par un promoteur homologue *tuf*.

Toutes les constructions obtenues dans les différentes études permettent de localiser une protéine particulière au sein du mycoplasme mais aucune ne permet un marquage du mycoplasme dans son ensemble ou la visualisation directe des colonies fluorescentes par microscopie d'épifluorescence. Un tel marquage est pourtant indispensable pour le suivi direct des mycoplasmes, notamment pour l'étude des interactions entre les mycoplasmes et les cellules de l'hôte qu'ils infectent.

I.2 objectifs :

En utilisant le système d'expression de gènes développé au chapitre précédent, nous voulions mettre au point un outil moléculaire permettant le marquage des mycoplasmes par fluorescence. L'obtention de mycoplasmes marqués nous permettrait notamment une détection directe du pathogène pour son suivi lors d'une infection. Pour répondre à cet objectif, les protéines fluorescentes à faire exprimer aux mycoplasmes doivent être soigneusement choisies.

Nous voulions aussi profiter de l'expression de ces gènes rapporteurs pour tester la versatilité de notre outil d'expression, notamment en évaluant le niveau de fluorescence conféré par le pMT/exp chez une espèce de mycoplasme éloignée du groupe mycoides.

Enfin, nous voulions démontrer l'utilité des mycoplasmes fluorescents pour les études envisagées, notamment pour le suivi des interactions des mycoplasmes avec les

cellules de l'hôte *in vitro*. Nous avons utilisé un modèle d'infection de phagocytes afin de vérifier si le signal obtenu était suffisant pour détecter les mycoplasmes à l'intérieur de cellules.

II résultats et discussion

II.1 choix des protéines fluorescentes et synthèse de gènes optimisés

L'expression de marqueurs fluorescents chez les mycoplasmes reste assez rare et comporte beaucoup de difficultés (Duret et al., 2003). Pour notre étude, nous avons fait le choix de différentes protéines fluorescentes à exprimer chez les mycoplasmes selon plusieurs critères tels que l'intensité de fluorescence, la résistance de la fluorescence en milieu acide (comme à l'intérieur d'une vacuole de phagocytose) et leur taille et complexité, qui ne doit pas être trop importante (seulement des monomères). Les différents critères ayant servi à sélectionner les protéines sont résumés dans la **table 6**.

CARACTERISTIQUES	GFP2	mCherry	mKO2	mNeongreen
Oligomérisation	Monomérique	Monomérique	Monomérique	Monomérique
Nombre d'acides aminés	238	256	218	256
Excit./Emiss. maximum (nm)	488/510	587/610	551/565	506/517
Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}cm^{-1}$)	nd	72000	63000	116000
Fluorescence quantum yield	nd	0.22	0.62	0.80
Brillance	nd	15.8	39.6	92.8
sensibilité au pH	nd	pKa<4.5	pKa=5.5	pKa=5,7
Cytotoxicité	nd	nd	aucune	nd
Résistance à la fixation par PFA	nd	nd	+++	nd

Table 6 : Caractéristiques physico-chimiques des différentes protéines fluorescentes utilisées au cours de ce travail. Nd : données non déterminées ou non disponibles

Ainsi, compte tenu de ces critères, plusieurs marqueurs ont été sélectionnés : mCherry (Shaner et al., 2004), mKO2 (Sakaue-Sawano et al., 2008) et mNeongreen (Shaner et al., 2013). Ces protéines ont des spectres d'émission différents : et respectivement dans le rouge, l'orange et le vert. En plus de ces trois marqueurs nous avons déjà au laboratoire la protéine GFP2, un variant de la GFP optimisé pour la cytométrie en flux et présentant une

intensité de fluorescence 100 fois plus élevée (Cormack et al., 1996). Les chromophores de ces protéines se forment spontanément sans cofacteurs ou enzymes additionnelles. Leur maturation ne nécessite pas non plus de modification post-traductionnelle, ce qui les rend en théorie utilisables chez tous les organismes. Les protéines mNeonGreen et mKO2 ont toutes les deux une brillance très importante et mCherry demeure très résistant au pH faible. Nous avons choisi d'utiliser ces protéines pour marquer les mycoplasmes au niveau cytoplasmique au lieu de cibler une présentation au niveau de la membrane cellulaire pour éviter l'exposition directe des marqueurs fluorescents à l'environnement, notamment lors de l'infection des cellules.

Les séquences des gènes GFP2, mCherry, mKO2 et mNeonGreen ont été extraites à partir de la base de données GenBank (NCBI). Dans le but d'augmenter le rendement de la transcription/traduction, nous avons optimisé toutes ces séquences suivant le code génétique de *Mmm* (**Table 7**). La base de données d'utilisation des codons « Codon Usage Database », accessible depuis le site <http://www.kazusa.or.jp/codon/>, a été utilisée pour analyser la fréquence de l'utilisation de chaque codon par la souche type de *Mmm*, PG1. Pour chaque acide aminé, nous avons choisi le codon le plus fréquemment utilisé pour l'optimisation automatique des codons à l'aide d'un petit logiciel de bio-informatique développé au CIRAD.

Acide aminé	Nucléotide	Acide aminé	Nucléotide
F	TTT	H	CAT
L	TTA	Q	CAA
I	ATT	N	AAT
M	ATG	K	AAA
V	GTT	D	GAT
S	TCA	E	GAA
P	CCA	C	TGT
T	ACT	W	TGA
A	GCT	R	AGA
Y	TAT	G	GGA

Table 7: Usage préférentiel des codons chez *Mmm*. Chaque acide aminé correspond la séquence nucléotidique du codon le plus fréquemment utilisé par la souche type PG1.

Ainsi, le pourcentage en GC est fortement réduit par rapport à la séquence d'origine mais est toujours supérieur à la limite inférieure de 25% que nous avons fixé (**Table 8**).

Fluorochrome	Séquences
GFP2opt 717 pb 26.6 % GC	CCATGGATGTCAAAAGGAGAAGAATTATTTACTGGAGTTGTTCCAATTTAGTTGAATTAGATGGAGATGTTAAT GGACATAAATTTTCAGTTTCAGGAGAAGGAGAAGGAGATGCTACTTATGGAAAATTAACTTTAAATTTATTTGT ACTACTGGAAAATTACCAGTTCCATGACCAACTTTAGTTACTACTTTTGCTTATGGATTACAATGTTTGTCTAGATA TCCAGATCATATGAAACAACATGATTTTTTAAATCAGCTATGCCAGAAGGATATGTTCAAGAAAAGAATATTTT TTTAAAGATGATGGAATATAAACTAGAGCTGAAGTTAAATTTGAAGGAGATACCTTAGTTAATAGAATTGAA TTAAAAGGAATTTGATTTTAAAGAGATGGAATATTTAGGACATAAATTAGAATATAATTATAATTCACATAATG TTTATATTATGGCTGATAAACAAAAAATGGAATTAAGTTAATTTTAAAATTAGACATATAATTGAAGATGGATC AGTTCAATTAGCTGATCATTATCAACAAATACTCCAATTGGAGATGGACCAAGTTTATTACCAGATAATCATTATT TATCAACTCAATCAGCTTTATCAAAAGATCCAAATGAAAAAGAGATCATATGTTTTATTAGAATTTGTTACTGCTC TGCTGGAATTACTCATGGAATGGATGAATTATATAAATACCTTAAG
mCherryopt 711 pb 29.4% GC	CCATGGATGTTTCAAAAGGAGAAGAAGATAATATGGCTATTATTAAGAATTTATGAGATTTAAGTTTCATATG GAAGGATCAGTTAATGGACATGAATTTGAAATTTGAAGGAGAAGGAGAAGGAAGACCATATGAAGGAACCTCAA CTGTAAATTTAAAGTTTACTAAAGGAGGACCATACCATTTGCTTGAGATATTTTATCACCACAATTTATGTATGG ATCAAAAGCTTATGTTAAACATCCAGCTGATATTTCCAGATTATTTAAATTTATCATTCCAGAAGGATTTAAATGA GAAAGAGTTATGAATTTTGAAGATGGAGGAGTTGTTACTGTTACTCAAGATTCATCATTACAAGATGGAGAAATTT ATTTATAAAGTTAAATTAAGAGGAACATAATTTCCATCAGATGGACCAAGTTATGCAAAAAAAACATATGGATGA GAAGCTTCATCAGAAAGATGTATCCAGAAGATGGAGCTTTAAAGGAGAATTAACCAAGATTAATTAATTA AGATGGAGGACATTATGATGCTGAAGTTAAACTACTTATAAAGCTAAAAAACCAGTTCAATTACCAGGAGCTTA TAATGTTAATATTAATAGATATTACTTCACATAATGAAGATTACTATTGTTGAACATATGAAGAGCTGAA GGAAGACATTCACCTGGAGGAATGGATGAATTATATAAATAGCTTAAG
mKO2opt 657 pb 30.9 % GC	CCATGGATGTTTCAAGTTATTAACAGGAAATGAAATGAGATATTATGGATGGATCAGTTAATGGACATGAA TTTACTATTGAAGGAGAAGGAACCTGGAAGACCATATGAAGGACATCAAGAAATGACTTTAAGAGTTACTATGGCT GAAGGAGGACCAATGCCATTTGCTTTGATTTAGTTTACATGTTTTTTGTTATGGACATAGAGTTTTTACTAAAT TCCAGAAGAAATCCAGATTATTTAAACAAGCTTTCCAGAAGGATTATCATGAGAAAGATCAATAGAATTTGAA GATGGAGGATCAGCTTCAGTTTCAAGCTCATATTTCAATGAAGGAAATACCTTTTATCATAAAATCAAAATTTACTG GAGTTAATTTCCAGCTGATGGACCAATTATGCAAAATCAATCAGTTGATTGAGAACCATCAACTGAAAAATTTAC TGCTTCAGATGGAGTTTTTAAAGGAGATGTTACTATGATTTAAATTAAGAGGAGGAGGAAATCATAAATGTCA AATGAAACTACTTATAAAGCTGCTAAAGAAATTTAGAAATGCCAGGAGATCATTATATTGGACATAGATTAGT TAGAAAACTGAAGGAAATATTACTGAACAAGTTGAAGATGCTGTTGCTCATTCACTTAAG
mNeongreenopt 711 pb 29.1 % GC	CCATGGATGTTTCAAAAGGAGAAGAAGATAATATGGCTTCAATACCAGTACTCATGAATTACATATTTTGGAT CAATTAATGGAGTTGATTTTATATGTTGGACAAGGAACCTGGAATCCAAATGATGGATATGAAGAATTAAT TAAATCAACTAAAGGAGATTTACAATTTTACCATGAATTTTAGTTCCACATATTGGATATGGATTTTATCAATAT TTACCATATCCAGATGGAATGTCACCAATTTCAAGCTGCTATGGTTGATGGATCAGGATATCAAGTTTCATAGAATA TGCAATTTGAAGATGGAGCTTCATTAACTGTTAATTATAGATATACTTATGAAGGATCACAATTTAAAGGAGAAGC TCAAGTTAAAGGAAGTGGATTTCCAGCTGATGGACCAAGTTATGACTAATTCATTAAGTGTGCTGATTGATGTA TCAAAAAAACTTATCCAAATGATAAACTATTATTTCAACTTTTAAATGATCATATACTACTGGAAATGGAAAA GATATAGATCAACTGCTAGAACTACTTACTTTTGTAAACCAATGGCTGCTAATTTTAAAAAATCAACCAATG TATGTTTTAGAAAACTGAATTAACCAATCAAAACTGAATTAATTTTAAAGAAAGACAAAAAGCTTTTACTG ATGTTATGGGAATGATGAATTATATAAATACCTTAAG

Table 8 : Séquences optimisées selon l'usage préférentiel de codons de *Mmm* pour GFP2opt, mCherryopt, mKO2opt et mNeonGreenopt.

En vert les sites de restriction *NcoI* en 5' et *AflIII* en 3' ; en rouge les codons start en 5' et stop en 3'. Il est aussi indiqué le pourcentage en GC des séquences ainsi que leur taille.

Nous avons aussi analysé les génomes de *M. agalactiae* PG2 (groupe Hominis) et *Ureaplasma parvum* serovar 3 ATCC 700970 (groupe Pneumoniae), qui étaient disponibles sur le site « Codon Usage Database », pour évaluer si cette optimisation de codons était spécifique à *Mmm* ou plus largement applicable chez les *Mollicutes*. Lorsque l'on compare l'usage préférentiel de codons d'espèces distantes de mycoplasmes, on se rend compte qu'ils sont très similaires. En effet, seulement deux et trois codons préférentiels diffèrent

respectivement entre ces deux espèces et *Mmm*. De plus, dans tous les cas, les codons choisis pour l'optimisation chez *Mmm* apparaissent en seconde position chez les autres espèces et sont fréquemment utilisés aussi par ces mycoplasmes. L'optimisation des codons effectuée ici semble alors être applicable à des mycoplasmes distants phylogénétiquement.

Les séquences optimisées de chacun des trois gènes rapporteurs sélectionnés ont été synthétisées par la société Proteogenix (Schiltigheim, France) et clonées dans un vecteur navette PucSP. Les sites de restriction *Nco*I en 5' et *Afl*III en 3' ont été ajoutés aux extrémités des séquences optimisées pour permettre un clonage orienté dans le vecteur pMT/exp.

II.2 Construction des différents plasposons pMT/fluor

Les vecteurs PucSP contenant chacun des gènes des marqueurs fluorescents ont été digérés par *Nco*I et *Afl*III et les fragments contenant les gènes de marquage ont été clonés dans le pMT/exp. Les différentes constructions ont été réalisées, puis produites chez *E. coli* et vérifiées par séquençage avec les amorces pMT85-Spelcloning_F et MT85_F (**table 3**). Le rendement de cette transformation était de 15% de clones positifs pour mCherry, 25% pour mKO2 et à 75% pour mNeonGreen. Les plasmides ainsi obtenus (pMT/fluor) ont été nommés respectivement pMT/GFP2, pMT/mKO2, pMT/mCherry et pMT/mNeonGreen (**figure 20**).

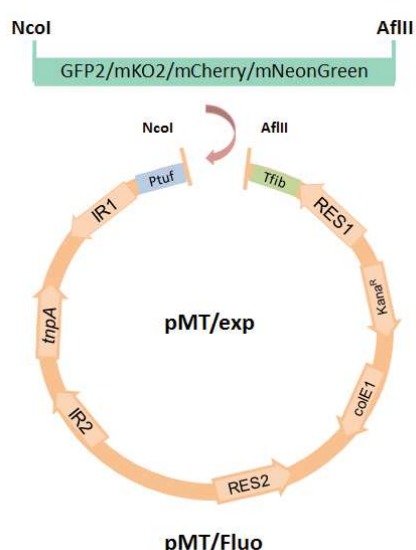


Figure 20 Obtention des pMT/fluor par clonage aux sites de restriction *Nco*I et *Afl*III dans le pMT/exp des séquences synthétiques (optimisées par rapport à l'usage préférentiel des codons de *Mmm*) des gènes : GFP2, mKO2, mCherry et mNeonGreen.

II.3 Obtention et criblage des différents mutants fluorescents

Nous avons transformé en première intention la souche virulente de *Mmm* Rita avec les différents pMT/fluo afin d'évaluer l'efficacité de notre système d'expression avec des protéines hétérologues. L'efficacité de transformation a varié entre 10^{-5} et 10^{-6} UFC transformants / UFC totales. Chaque transformation nous a permis d'obtenir plusieurs centaines de transformants. Nous avons sélectionné les transformants parmi les plus rapides à pousser sur milieu sélectif et avons criblé les différents clones mutants exprimant les protéines fluorescentes en premier lieu par PCR spécifique des gènes de fluorescence insérés (**table 3**). Les résultats de ces PCR nous ont montré que les transformants possédaient bien les gènes de fluorescence désirés. A ce stade nous ne pensions pas possible de cribler les mutant directement sur gélose au microscope à fluorescence. Pourtant après avoir observé les colonies au microscope nous avons constaté que nous pouvions clairement discriminer les clones fluorescents des clones sauvages, et ceci pour trois des marqueurs de fluorescence excepté le GFP2 (**Figure 21**).

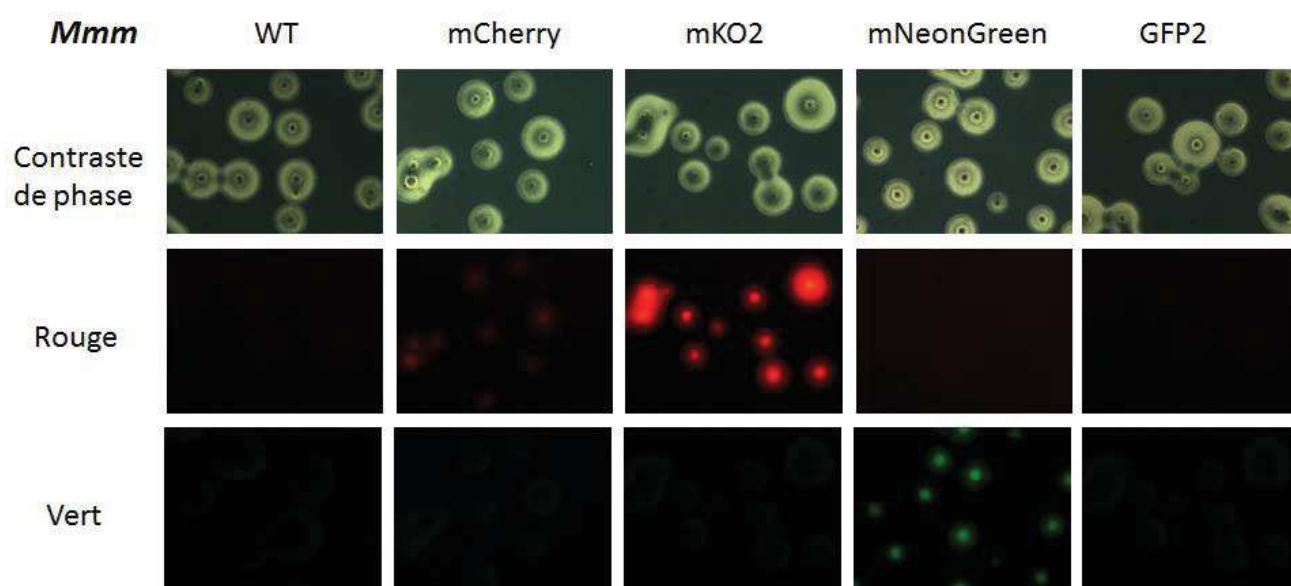


Figure 21 : Photographies prises au microscope à fluorescence de colonies de *Mmm* après 3 jours de culture sur milieu gélosé. De gauche à droite : *Mmm* souche sauvage Rita (WT) et souches de Rita transformées pour exprimer respectivement mCherry, mKO2, mNeonGreen et GFP2. De haut en bas : l'image a été prise en utilisant le contraste de phase, l'épi-fluorescence avec un filtre CY3 (rouge) ou un filtre eGFP (vert). Grossissement X5

Ce résultat est très intéressant puisque le niveau de fluorescence est tel que l'on peut s'affranchir de l'étape de criblage par PCR pour la sélection des mutants. De plus, les niveaux de fluorescence observés, notamment avec mKO2, étaient très satisfaisants.

Pour vérifier si ce système pouvait être également utilisé chez d'autres espèces de mycoplasmes nous avons choisi de transformer *M. bovis* avec les mêmes constructions sans toutefois les constructions GFP2 qui n'avaient pas donné de résultats satisfaisants. *Mmm* et *M. bovis* étant deux mycoplasmes très éloignés phylogénétiquement (Thompson et al., 2011), ce choix permettait alors de démontrer la versatilité du système. Nous avons choisi de transformer la souche virulente Oger2 de *M. bovis* qui pouvait être utilisée ensuite comme modèle d'étude. Les mutants résultants de la transformation de *M. bovis* avec les trois constructions fluorescentes sont représentés en **figure 22**. L'efficacité de transformation était équivalente à celle obtenue chez *Mmm*. On peut y voir un niveau de fluorescence très satisfaisant des colonies mutantes de *M. bovis* sur gélose par microscopie de fluorescence. Le système d'expression développé durant cette thèse permet une utilisation plus large que celle pour laquelle nous l'avions initialement prévue.

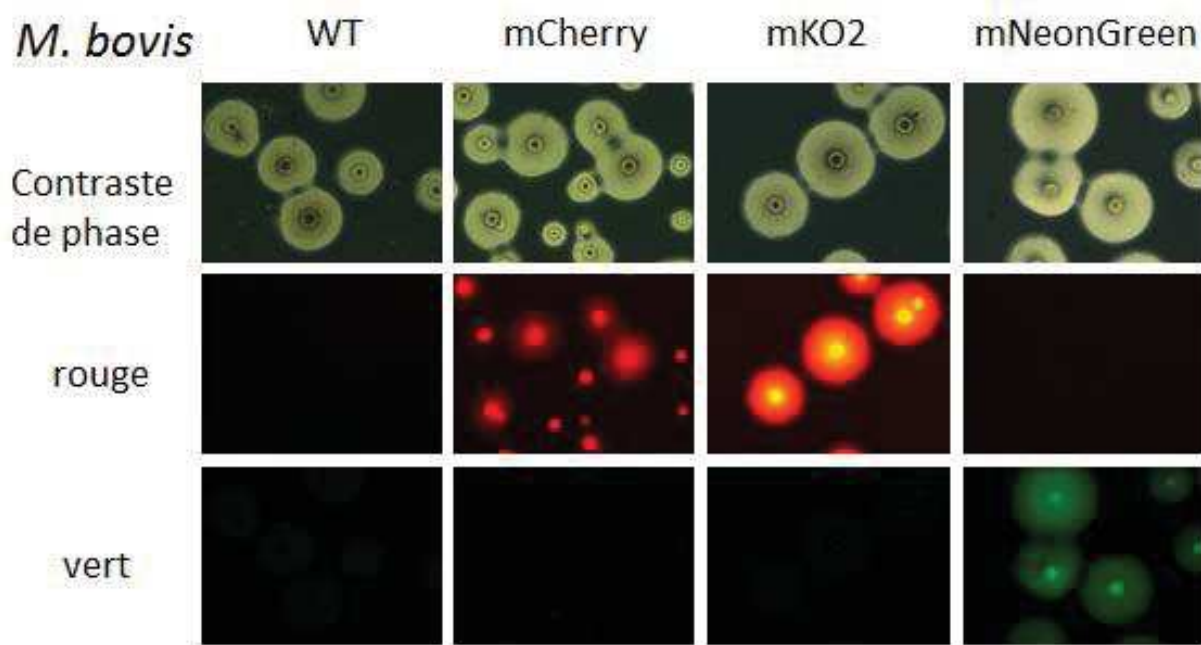


Figure 22 : Photographies prises au microscope à fluorescence de colonies de *M. bovis* après 3 jours de culture sur milieu gélosé. De gauche à droite : *M. bovis* souche sauvage Oger2 (WT), et les souches d'Oger2 transformées pour exprimer respectivement mCherry, mKO2 et mNeonGreen. De haut en bas : l'image a été prise en utilisant le contraste de phase, l'épi-fluorescence avec un filtre CY3 (rouge) ou un filtre eGFP (vert).

Il est important de souligner que nous n'avons pas observé de toxicité, ni de retard de croissance ou de différence phénotypique chez les mutants fluorescents. Cette absence de modification phénotypique des transformants est non négligeable parce qu'il a été montré, par exemple, que l'expression de la GFP en fusion avec la spiraline (protéine de surface) chez *S. citri* entraînait une réduction de la taille des colonies et des modifications morphologiques, et que les mutants n'étaient pas stables et se subdivisaient en plusieurs sous-populations, n'exprimant pas de fluorescence (Duret et al., 2003). De plus, dans nos résultats, chez tous les transformants obtenus, que ce soit chez *Mmm* ou *M. bovis*, le niveau de fluorescence a été conservé même après 10 passages successifs *in vitro* en absence de pression antibiotique. Ceci démontre bien la stabilité de l'insertion et de l'expression chez les deux espèces transformées.

Les cultures des différents transformants ont également été analysées par microscopie confocale pour visualiser non pas la colonie entière mais le mycoplasme comme cellule individuelle. La **figure 23** ci-dessous représente un clone de *Mmm* exprimant mNeonGreen. L'expression de la protéine verte est suffisante pour permettre l'observation de particules avec une taille estimée à 0,5µm, correspondant à la taille typique d'une cellule unitaire de mycoplasme (Citti and Blanchard, 2013).

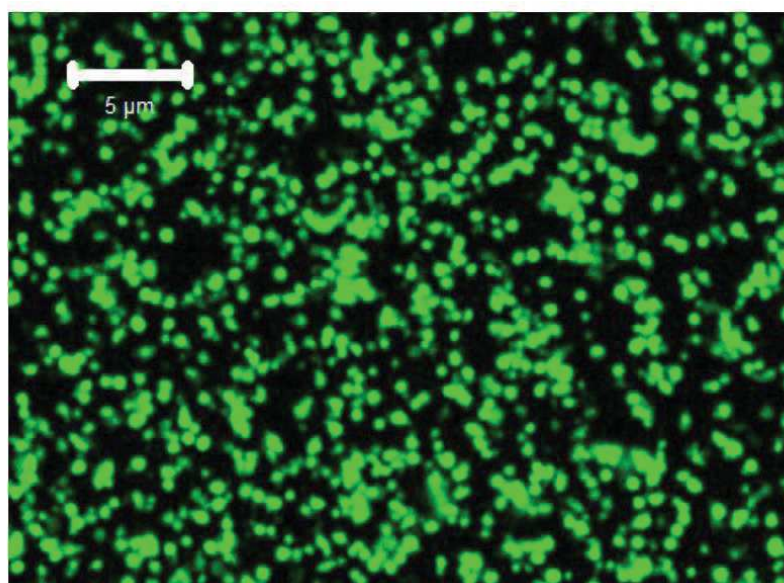


Figure 23 : photographie prise en microscopie confocale d'une culture de *Mmm* exprimant mNeonGreen. Les mycoplasmes ont été cultivés pendant 24 heures puis lavés avant d'être fixé pour l'observation microscopique. La barre d'échelle représente 5 µm

II.4 Caractérisation des mutants

- Caractérisation du niveau de fluorescence chez *Mmm* et *M. bovis* pour démontrer la versatilité du système d'expression

Pour obtenir une caractérisation plus précise et quantitative du niveau de fluorescence nous avons utilisé la cytométrie en flux. En effet, cette technique permet de quantifier le niveau de fluorescence d'un mycoplasme isolé à la différence du microscope de fluorescence qui reflète la fluorescence d'une colonie dans son ensemble sans pour autant la quantifier. Avec le cytomètre que nous avons au laboratoire nous ne pouvons caractériser que les mutants exprimant des fluorescences vertes comme mNeonGreen et GFP2. En effet, notre cytomètre ne dispose pas des équipements permettant la visualisation des fluorescences émises par mCherry et mKO2. Pour ces raisons pratiques la suite des analyses se fera exclusivement avec les clones mutants exprimant des fluorescences vertes.

Nous avons réalisé des analyses comparatives et quantitatives en cytométrie en flux pour différents clones exprimant la protéine fluorescente mNeonGreen chez *Mmm* et chez *M. bovis* (**table 9**). Ces expériences ont été réalisées à partir de cultures liquides en fin de phase exponentielle. Dans cette table figurent aussi les valeurs d'intensité de fluorescence des clones *Mmm* exprimant la protéine GFP2 optimisée qui n'avaient pas donné de résultats satisfaisants sur gélose. Ces résultats montrent que les différentes espèces sauvages (WT) étudiées n'ont pas la même auto fluorescence (*M. bovis* étant plus auto fluorescent que *Mmm*). Tous les clones mutants testés ont des niveaux de fluorescence supérieurs à celui de la souche sauvage respective. Néanmoins, on peut noter que les clones exprimant la GFP2 ont des niveaux de fluorescence bien inférieurs à ceux exprimant mNeonGreen. La même expérience a été faite après 7 jours de culture et les intensités de fluorescence mesurées avaient augmenté au cours du temps (données non montrées).

Souches	MFI	Souches	MFI
<i>Mmm</i> Rita WT	42	<i>M. bovis</i> Oger2 WT	213
<i>Mmm</i> Rita N1	996	<i>M. bovis</i> Oger2 N1	2925
<i>Mmm</i> Rita N2	1163	<i>M. bovis</i> Oger2 N2	2200
<i>Mmm</i> Rita N3	1187	<i>M. bovis</i> Oger2 N3	2766
<i>Mmm</i> Rita N4	1054	<i>M. bovis</i> Oger2 N4	2017
<i>Mmm</i> Rita N6	1203	<i>M. bovis</i> Oger2 N5	2410
<i>Mmm</i> Rita N7	1152	<i>M. bovis</i> Oger2 N6	2437
<i>Mmm</i> Rita N9	3031	<i>M. bovis</i> Oger2 N7	2712
<i>Mmm</i> Rita G1	239	<i>M. bovis</i> Oger2 N8	3708
<i>Mmm</i> Rita G2	350		
<i>Mmm</i> Rita G8	610		

Table 9 : Comparaison des médianes d'intensité de fluorescence (MFI) des différents clones fluorescents exprimant la GFP2 (GX) chez les mutants de *Mmm* et la mNeonGreen (NX) chez les mutants de *Mmm* et *M. bovis* par rapport au souches sauvages. Résultats d'analyses réalisées en cytométrie en flux

Les colonies du clone de *Mmm* N9 semblaient être beaucoup plus fluorescentes sur gélose (**figure 24**) et ce clone possédait effectivement une intensité de fluorescence nettement supérieure aux autres clones. Nous avons choisi de ne pas continuer les expériences suivantes avec ce clone, qui possède certainement plusieurs copies du transposon dans son génome et qui, de ce fait, peut posséder plusieurs mutations qui n'ont pas pu être caractérisées par séquençage. En effet nous ne sommes pas parvenus à identifier les différents lieux d'insertion des plusieurs copies du transposon dans le génome. Toutefois, il est intéressant de voir qu'une multiple insertion du système d'expression génique permet d'augmenter significativement l'intensité de fluorescence émise.

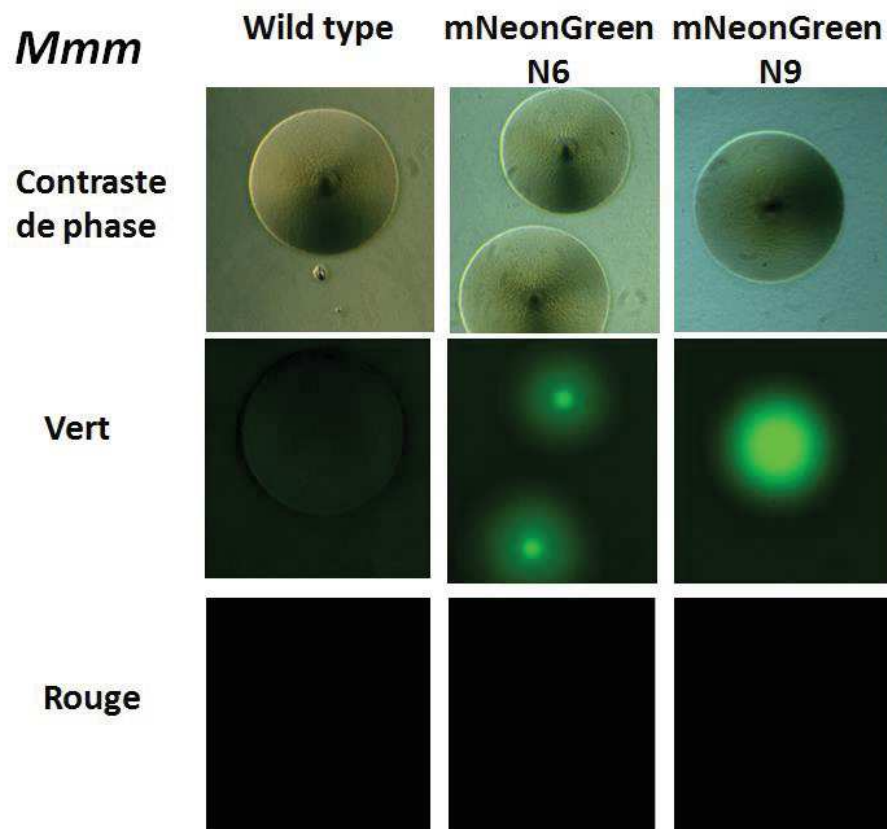


Figure 24: Comparaison des niveaux de fluorescence de colonies de *Mmm* après 3 jours de culture sur milieu gélosé. De gauche à droite : *Mmm* souche sauvage Rita (WT) et souches de Rita transformées pour exprimer mNeonGreen, respectivement clones N6 et N9. De haut en bas : l'image a été prise au microscope optique en utilisant le contraste de phase et l'épi-fluorescence avec un filtre eGFP (vert) ou avec un filtre CY3 (Rouge). Grossissement X10.

Nous avons choisi les clones *Mmm* N6 et *M. bovis* N8 pour illustrer en détail les résultats de pourcentage de cellules fluorescentes dans la population générale (**figure 25**). Sur l'histogramme de cette figure nous pouvons voir une parfaite discrimination des mycoplasmes fluorescents par rapport aux souches sauvages, surtout pour les clones mutants de *M. bovis*. Les figures présentant une analyse en quadrants montrent également qu'il existe des niveaux d'intensité de fluorescence plus variables chez *Mmm* que chez *M. bovis*, avec la présence notamment d'une population non fluorescente y compris chez le mutant mNeonGreen.

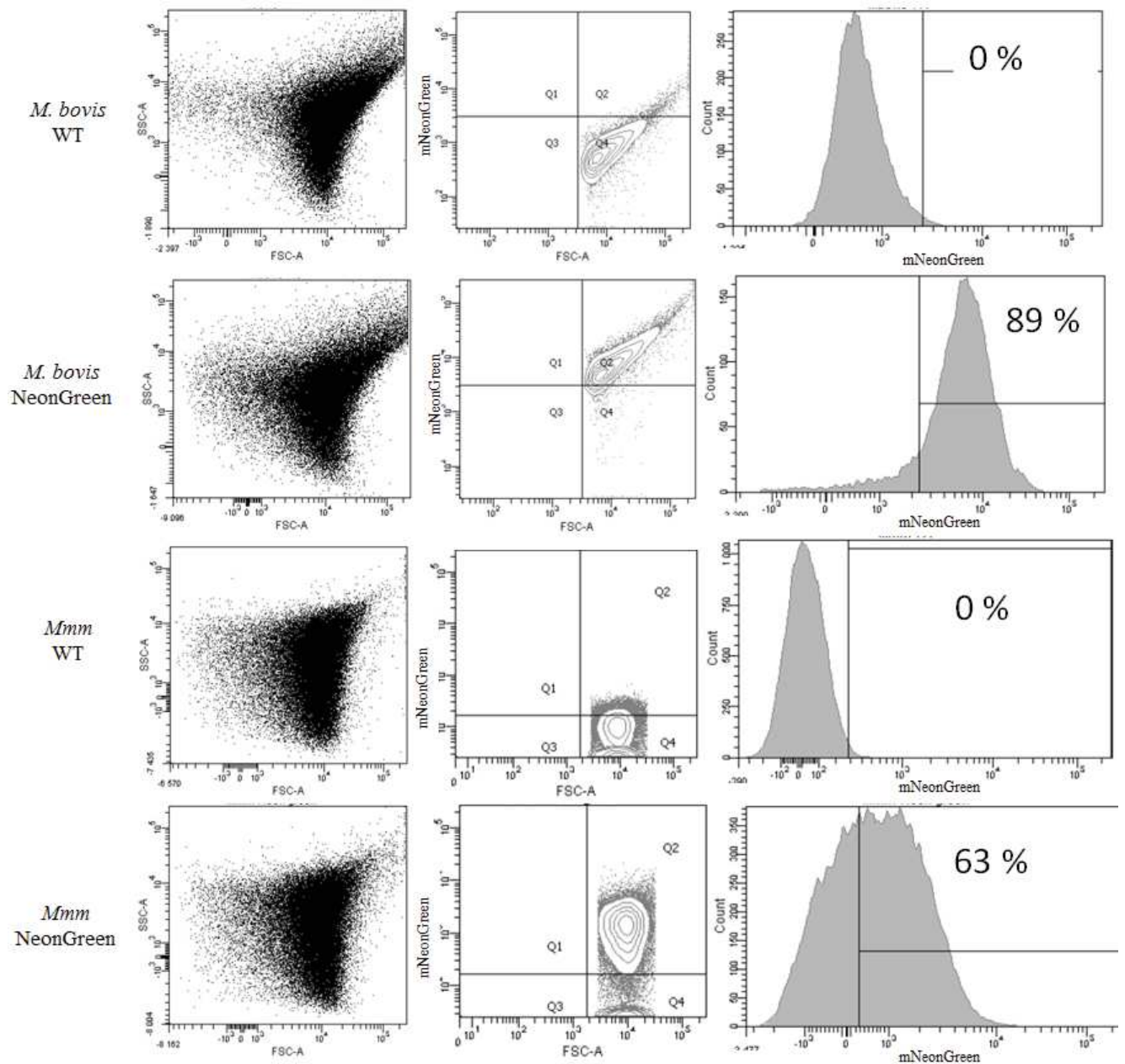


Figure 25 : Analyses de la fluorescence en cytométrie en flux de *M. bovis* ou *Mmm* ; souche sauvage (WT) ou exprimant mNeonGreen clone N8 pour *M. bovis* et N6 pour *Mmm* après 24 heures de culture.

La colonne de gauche reflète la morphologie de la population (FSC vs SSC), celle du milieu la fluorescence en fonction de la taille (FSC vs mNeonGreen) et celle de droite un histogramme quantitatif du nombre de mycoplasmes en fonction de l'intensité de fluorescence.

Pour vérifier la reproductibilité des intensités de fluorescence nous avons réalisé trois expériences quantitatives indépendantes à partir de cultures liquides en fin de phase exponentielle des clones N6 pour *Mmm* et N8 pour *M. bovis* et leurs souches sauvages

respectives. Les résultats quantitatifs en médianes d'intensité de fluorescence (MFI) obtenus par cytométrie en flux sont présentés dans la **table 10**. Les MFI des mutants mNeonGreen de *M. bovis* sont supérieures à celles des mutants *Mmm*. Ceci est dû à une différence d'auto fluorescence entre ces deux espèces même chez les souches sauvages (WT). Pour analyser et pour pouvoir comparer le gain de fluorescence entre les souches sauvages et les souches transformées on a eu recours à un calcul de ratio de MFI. L'obtention de ces ratios nous permet de conclure que le gain de fluorescence est similaire chez *M. bovis* et *Mmm*. Ils varient de X10 à X17.

MFI		<i>Mmm</i>		<i>M. bovis</i>		
expériences	Wild type ^a	mNeon ^a	Ratio ^b	Wild type ^a	mNeon ^a	Ratio ^b
n°1	89	1015	11,4	225	3769	16,8
n°2	72	1140	15,8	693	7222	10,4
n°3	65	929	14,3	578	7240	12,5

Table 10 : Comparaison des intensités de fluorescence entre les clones N6 (*Mmm*) et N8 (*M. bovis*) et leur souches sauvages respectives. L'expérience a été réalisée trois fois indépendamment en cytométrie en flux. ^a médianes d'intensité de fluorescence (MFI), ^b ratio des MFI des clones fluorescents par rapport à leurs souches sauvages respectives.

Ces résultats ont permis de démontrer que le système d'expression développé initialement pour une utilisation chez le groupe mycoides peut être applicable, entre autre, au groupe hominis. Ces deux groupes phylogénétiques étant très éloignés (Sirand-Pugnet et al., 2007), l'outil d'expression de gènes est de ce fait versatile. En plus, l'analyse des intensités de fluorescence obtenues à partir des mutants mNeonGreen de *Mmm* et *M. bovis* est très satisfaisante et nous permet d'envisager leur utilisation pour les études d'interaction avec des cellules de l'hôte.

- Vérification de l'intensité de fluorescence émise par les mycoplasmes inactivés.

Nous avons voulu savoir si les mycoplasmes fluorescents une fois morts continuaient à émettre de la fluorescence détectable. Cette information est indispensable pour savoir si les mycoplasmes fluorescents peuvent être détectés dans certaines expériences et après

différents traitements. Ainsi, nous avons tué à la chaleur (56°C pendant 30 minutes) nos mutants fluorescents N6 de *Mmm* et N8 de *M. bovis*, puis vérifié l'émission de fluorescence au court du temps en cytométrie en flux et en microscopie confocale. Nous avons montré que les mycoplasmes morts continuaient à émettre de la fluorescence à un niveau comparable au mycoplasme vivant, uniquement pendant 3 heures après le traitement à la chaleur. Passé ce délai la fluorescence n'est plus détectable par cytométrie en flux et microscopie confocale et ce, jusqu'à 72 heures après le traitement (données non montrées).

- Caractérisation du lieu de l'insertion

L'utilisation du système pMT/fluo entraîne une intégration au hasard dans le génome du mycoplasme de la construction permettant l'expression des protéines fluorescentes. Ainsi nous avons utilisé un système de séquençage permettant de localiser l'insertion d'une vingtaine de clones différents pour chacune des constructions chez *Mmm* et *M. bovis*. Les sites d'insertion des clones sélectionnés pour la suite des expériences sont précisés dans la **table 11**. Les mutants sélectionnés ne devaient pas avoir eu l'insertion dans un gène ayant un rôle clef pour la virulence *in vivo*. Les mutations engendrées par l'insertion ne devaient pas modifier la biologie du mycoplasme car toutes les études réalisées en aval s'en retrouveraient faussées. Nous avons donc sélectionné chez la plupart des mutants *Mmm* et *M. bovis* des mutations où l'insertion s'est produite, soit dans une transposase, soit dans des gènes présents en plusieurs copies dans le génome, soit dans des pseudogènes ou dans une région non codante. Pour le mutant de *Mmm* exprimant mKO2, le gène dans lequel s'est inséré le transposon est apparemment tronqué et flanqué par des sites d'insertion (IS).

Pour pouvoir sélectionner des clones mutants fluorescents intéressants pour les expériences d'interaction avec les cellules *in vitro*, nous avons fait attention à garder un nombre minimal de passages *in vitro* de ces clones. En effet, nous ne voulions pas introduire de biais qui seraient liés à une dérive génétique.

Les mutants mNeonGreen chez *Mmm* et *M. bovis* sélectionnés dans la **table 11** sont les clones N6 pour *Mmm* et N8 pour *M. bovis*. Ce sont ces clones qui seront utilisés tout au long des analyses d'interaction avec les cellules de l'hôte.

		Souches fluorescentes	Lieu d'insertion dans le génome des souches de référence (PG1 ou PG45)
Mmm	Rita	mCherry	Région intergénique, 98pb après le CDS MSC_0650 « protéine hypothétique » et 302pb avant le MSC_0651 « protéine hypothétique »
		mKO2	MSC_0248 « N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase »
		mNeonGreen	MSC_0109; MSC_0974; MSC_0982; MSC_0988 glycosyltransferase présente en 4 copies dans le génome (dont certaines dégénérées,
M. bovis	Oger2	mCherry	ISMbov1 CDS Transposase
		mKO2	nd
		mNeonGreen	ISMbov6 CDS Transposase présente en 5 copies dans le génome

Table 11 : Sites d'insertion du transposon dans les différentes souches mutantes fluorescentes chez *Mmm* et *M. bovis*. Les sites d'insertion du transposon dans le génome des souches PG1 (n° Genbank BX293980.2) de *Mmm* ou PG45 (CP002188) de *M. bovis* sont décrits par leurs annotations respectives. Nd ; non déterminé.

II.5 Démonstration de l'utilité des mycoplasmes fluorescents pour l'étude des interactions avec les cellules de l'hôte *in vitro*

Après avoir caractérisé le niveau de fluorescence des mutants de deux espèces de mycoplasme, *Mmm* et *M. bovis*, nous devons vérifier que ce niveau était suffisant pour des études d'interaction entre les mycoplasmes et les cellules cibles. En effet, nous voulions que le marquage par fluorescence des mycoplasmes soit suffisant pour permettre une détection directe du mycoplasme, même à l'intérieur des cellules, sans avoir à ajouter une étape de marquage par immunofluorescence par exemple. Pour vérifier cela, nous avons mis en contact des macrophages dérivés de monocytes bovins avec nos deux espèces de mycoplasmes fluorescents. Après 30 minutes d'infection nous avons procédé aux marquages des membranes des macrophages et des noyaux cellulaires. Le résultat de cette infection est présenté en **figure 26** après analyse en microscopie confocale.

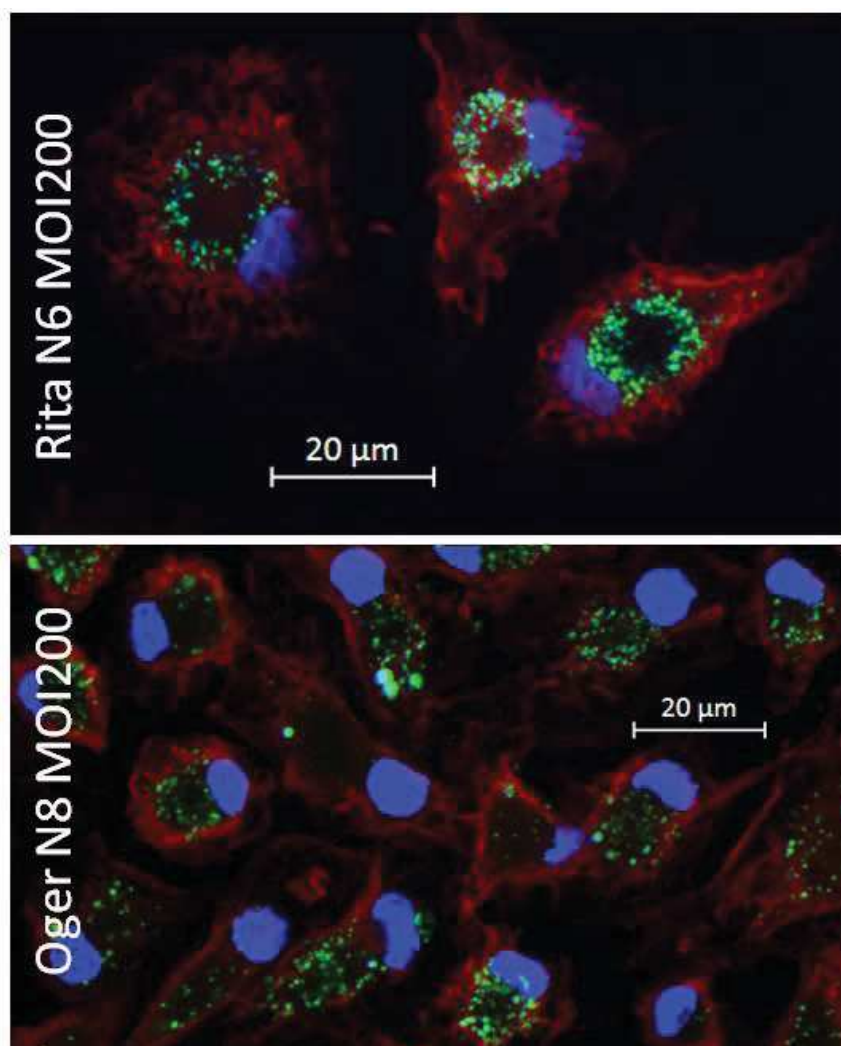


Figure 26 : Microscopie confocale de macrophages bovins infectés durant 30 minutes avec des mycoplasmes fluorescents. La photographie du haut montre des macrophages infectés à une MOI de 200 avec le mutant N6 de *Mmm* souche Rita, exprimant mNeonGreen. Celle du bas, montre des cellules infectées dans les mêmes conditions mais avec le mutant N8 de *M. bovis* souche Oger2, exprimant aussi mNeonGreen. Les barres d'échelle sont à 20 µm.

Sur ces images, on peut bien distinguer les mycoplasmes marqués en vert à l'intérieur du macrophage, dont la membrane est délimitée par un marquage rouge. Les mycoplasmes se trouvent dans le même plan focal que le noyau, dont l'ADN est marqué en bleu, ce qui démontre leur localisation intracellulaire. Les mycoplasmes fluorescents sont bien visibles, qu'ils soient individualisés ou en agrégats.

L'analyse quantitative par cytométrie en flux des cellules phagocytaires infectées avec des mycoplasmes intracellulaires est présentée en **figure 27**. Sur cette figure, on peut voir que l'intensité de fluorescence basale des macrophages est augmentée lorsqu'ils sont

infectés par les souches sauvages de mycoplasmes testés. Cette intensité varie selon l'espèce qui les infecte. En effet, ils sont plus auto-fluorescents après une infection par *M. bovis* que par *Mmm* (MFI de 7150 comparée à 2600 respectivement). L'infection de ces macrophages avec les souches fluorescentes permet une bonne discrimination par rapport aux infections par les souches sauvages. Les MFI sont ainsi multipliées par 10 pour une infection par *M. bovis* et par 4 pour une infection par *Mmm*. Le pourcentage de macrophages qui contiennent du mycoplasme fluorescent intracellulaire détectable par cette technique est de 96% pour ceux infectés avec *M. bovis* et 84% pour *Mmm*.

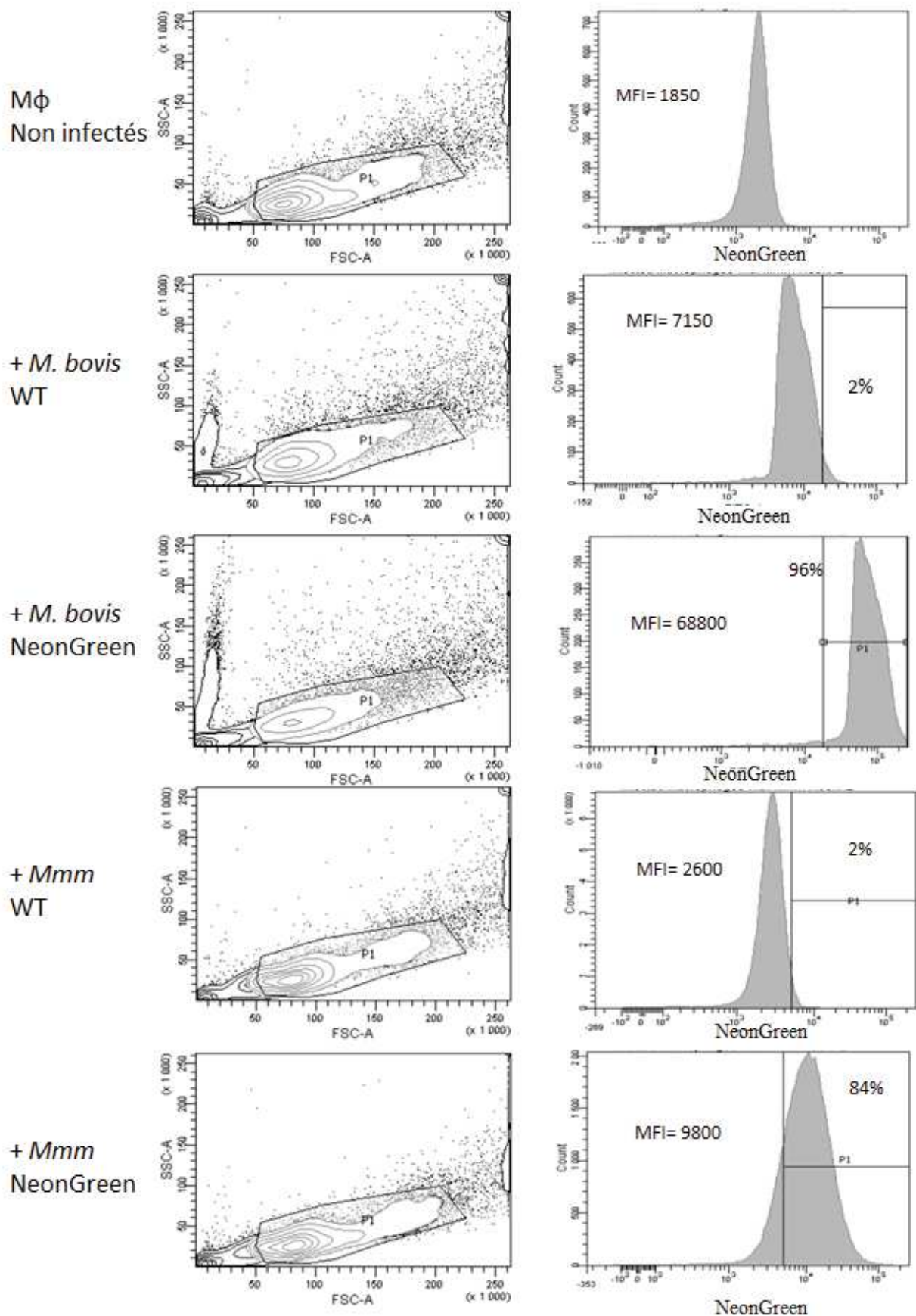


Figure 27 : Analyse de macrophages bovins infectés par des mycoplasmes fluorescents en cytométrie en flux. Les macrophages bovins (MΦ) ont été infectés durant 30 minutes avec *M. bovis* ou *Mmm* ; souche sauvage (WT) ou exprimant mNeonGreen. La colonne de gauche reflète la morphologie de la population (FSC vs SSC) et celle de droite un histogramme quantitatif du nombre de macrophages en fonction de l'intensité de fluorescence.

III Conclusions et perspectives

Nous avons ici développé un nouvel outil permettant de faire exprimer de façon constitutive des protéines fluorescentes chez les mycoplasmes. Cet outil a, dans un premier temps, été développé pour une expression optimale chez *Mmm* mais nous avons montré sa versatilité en démontrant son efficacité chez *M. bovis*. En effet, malgré l'éloignement phylogénétique de ces deux espèces (Sirand-Pugnet et al., 2007) le système d'expression fonctionne très bien chez chacune d'entre elles où trois protéines fluorescentes ont été exprimées avec succès. Des colonies fluorescentes rouges et vertes ont ainsi été observées par microscopie de fluorescence. De plus, nous n'avons pas observé de toxicité, ni de retard de croissance ou de différence phénotypique chez les mutants fluorescents.

Avant la réalisation de ce travail de thèse, hormis quelques outils d'expression développés avec de nombreuses limitations (Balish et al., 2003; Kenri et al., 2004; Tulum et al., 2014; Zimmerman and Herrmann, 2005), aucun outil aussi performant n'avait été décrit pour le marquage par fluorescence des mycoplasmes entiers. Aucun ne permettait d'observer directement sur milieu gélosé des colonies de mycoplasmes fluorescentes. Depuis, un système de marquage intrinsèque de *M. hyopneumoniae* avec la GFP permettant la visualisation de colonies vertes par microscopie de fluorescence a été décrit (Ishag et al., 2016). Dans ce travail d'Ishag et ses collaborateurs, le gène de la GFP (non optimisé) a été exprimé sous contrôle du promoteur de la P97 (adhésine principale de cette espèce) à partir d'un plasmide réplcatif *oriC*. Les colonies de transformants présentent une intensité de fluorescence très remarquable, particulièrement pour un pathogène fastidieux comme celui-ci. Ce résultat est assez surprenant aussi en vue de l'échec des études précédentes utilisant la GFP (Duret et al., 2003) et de nos résultats, plutôt décevants pour la GFP2. De plus, le système développé reste limité à l'utilisation chez *M. hyopneumoniae*, du fait de la spécificité de l'origine de réplcation, tandis que nos constructions peuvent être utilisées chez diverses espèces de mycoplasmes.

Nous avons attribué le succès de notre approche principalement au choix de protéines fluorescentes permettant une expression suffisante de la fluorescence chez les mycoplasmes. En effet, la GFP, qui est la protéine fluorescente la plus couramment utilisée, n'est pas celle qui a donné les meilleurs résultats ici, et ce même après optimisation de la séquence de son gène pour l'usage préférentiel des codons des mycoplasmes. En même

temps, bien que l'expression de la GFP2 n'ait pas été satisfaisante en termes d'intensité de fluorescence, aucune toxicité ou instabilité n'a été détectée chez ces mutants.

De façon intéressante, les gènes optimisés des protéines mNeonGreen, mKO2 et mCherry ont très bien fonctionné chez *M. bovis*, confirmant, entre autre, la versatilité du promoteur *tufA* de *Mmm* utilisé pour contrôler l'expression de ces gènes. L'optimisation des gènes hétérologues a été faite pour maximiser le rendement lors de la transcription afin que les séquences des protéines fluorescentes ne soient pas reconnues comme étrangères. Nous n'avons pas essayé de transformer les souches avec les séquences correspondantes aux gènes des protéines fluorescentes non optimisées, mais si on se fie à la littérature, il semblerait que les meilleurs résultats aient été obtenus après optimisation selon le code génétique des mycoplasmes (Tulum et al., 2014)

Le système que nous avons développé ici devrait être largement utilisable chez beaucoup d'espèces de mycoplasmes. La majeure limitation à cet outil est le fait que le gène *aacA-aphD* conférant la résistance antibiotique utilisée dans notre modèle ne peut pas s'appliquer à certains mycoplasmes qui sont, eux, naturellement résistants. C'est le cas notamment de *M. penetrans* et *M. fermentans* (Renaudin et al., 2014). Quant à *M. genitalium*, sa croissance est perturbée lors de l'expression du gène de résistance. Pour ces mycoplasmes, il faudrait donc remplacer le gène *aacA-aphD* par un autre plus adapté au modèle comme le gène de la chloramphénicol acetyl-transferase (*cat*) ou le gène de résistance à la tétracycline (*tetM*). Ces deux gènes de résistance ont déjà été utilisés et fonctionnent chez ces mycoplasmes (Renaudin et al., 2014). D'autres *Mollicutes* n'utilisent pas le codon UGA pour le tryptophane, ce qui est incompatible avec l'utilisation du transposon, qui porte un codon UGA-tryptophane dans le gène de la transposase *tnpA*. Il faudrait donc faire de la mutagénèse dirigée pour pouvoir utiliser notre système chez ces espèces.

Des mycoplasmes intrinsèquement fluorescents ont été développés. De plus, le niveau d'expression est tel qu'il permet aussi (et c'est le but recherché) d'étudier les mycoplasmes en interaction directe avec les cellules de l'hôte. Ainsi, le développement de ces systèmes d'expression de gènes fluorescents et leur validation pour le suivi des interactions des mycoplasmes avec les cellules hôtes ont fait l'objet d'une publication (« Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades ». J Biotechnol. 2016 Aug 4;236:35-44. doi:

10.1016). Le système d'expression de gènes fluorescents que nous avons développé ouvre donc une multitude de perspectives pour le suivi direct des mycoplasmes, notamment dans le cadre des études d'interaction entre les mycoplasmes et leur hôte, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. En effet, la possibilité d'éliminer la résistance antibiotique des mutants fluorescents est très intéressante pour d'éventuelles applications *in vivo*. L'application de ces outils à l'étude des interactions des mycoplasmes avec les cellules de l'hôte *in vitro* sera détaillée dans le chapitre suivant.

I Introduction

Depuis des décennies, les scientifiques essaient de comprendre les mécanismes spécifiques des interactions entre les bactéries du genre *Mycoplasma* et leurs hôtes, afin de mieux comprendre la pathogénie de ces maladies très largement répandues dans le monde animal. Ces mycoplasmes sont, la plupart du temps, décrits comme des bactéries extracellulaires étroitement associés aux cellules de l'hôte. Néanmoins, la capacité des mycoplasmes à envahir des cellules non phagocytaires dans certaines conditions expérimentales a été décrite par plusieurs auteurs dans différents modèles tels que *M. bovis*, *M. hominis*, *M. synoviae*, *M. suis*, *M. agalactiae* et *M. gallisepticum* (Bürki et al., 2015b; Diaz-Garcia et al., 2006; Dusanic et al., 2009; Groebel et al., 2009; Hegde et al., 2014; Vogl et al., 2008; Winner et al., 2000). Ces mycoplasmes peuvent donc être considérés comme des microorganismes intracellulaires facultatifs (Citti et al., 2005b). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus sont peu connus, mais l'adhérence des mycoplasmes aux cellules est considérée comme un prérequis essentiel pour l'invasion cellulaire.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à deux mycoplasmes pathogènes des bovins, à savoir *M. bovis* et *Mmm*. Ces deux mycoplasmes sont responsables de pneumopathies chez les bovins mais *M. bovis* est en plus responsable d'autres symptômes comme les mammites et arthrites. Cette différence de pathologie doit pouvoir s'expliquer par une diversité au niveau des capacités infectieuses et du tropisme cellulaire du mycoplasme. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer les deux espèces en ce qui concerne leur pouvoir infectieux et leurs mécanismes d'invasion et persistance.

I.1 Adhérence :

L'attachement des mycoplasmes aux cellules est essentiel pour l'invasion de celles-ci et également pour l'initiation de l'infection. L'absence de paroi cellulaire, caractéristique des mycoplasmes les oblige à exprimer directement sur leur membrane cellulaire des andhésines afin de pouvoir interagir avec des récepteurs spécifiques sur la membrane de la

cellule hôte. Cette étroite interaction entre le mycoplasme et la cellule hôte entraîne la création d'un microenvironnement qui permet l'apport en nutriments ainsi que l'accumulation de produits et métabolites entraînant des dommages cellulaires chez l'hôte (Razin, 1999). Les mécanismes d'adhérence ont été largement étudiés chez *M. pneumoniae* (Chourasia et al., 2014) et *M. genitalium* (Zeng et al., 2012), qui possèdent une organelle comprenant des adhésines spécialisées ainsi que des protéines accessoires nécessaires à l'attachement aux cellules hôtes. Chez *M. genitalium*, des mutants dépourvus des adhésines P1 et P30 ont été obtenus et ces mutations les rendent avirulents (Burgos et al., 2006). Chez cette espèce les adhésines sont donc considérées comme les principaux facteurs de virulence.

D'autres mycoplasmes, comme *M. bovis*, ne possèdent pas cette organelle spécialisée dans l'adhérence mais peuvent quand même adhérer aux cellules grâce à des protéines réparties à la surface du mycoplasme qui agissent comme adhésines (Behrens et al., 1996). L'adhérence chez *M. bovis* a été récemment révisé par Bürki et ses collaborateurs (Burki et al, 2015) : des essais d'adhérence *in vitro* ont été d'abord réalisés avec la souche PG45 de *M. bovis* aux cellules embryonnaires épithéliales bovines du poumon (EBL). Ces essais ont révélé que l'interaction est dépendante de la température d'infection, avec une adhérence maximale à 37°C. Les récepteurs cellulaires impliqués dans l'adhérence de *M. bovis* saturent à partir de 225 mycoplasmes par cellule. Selon les différents types cellulaires et les souches de *M. bovis* testées, le taux d'adhérence aux cellules varie fortement (3,4-19,1%) et ce, indépendamment de l'organe d'où ont été isolées ces souches. L'adhérence est significativement moins élevée chez les souches apathogènes de *M. bovis* comparée aux souches virulentes. De plus, lorsque des passages successifs d'une souche de *M. bovis* sont effectués, elle perd cette capacité à adhérer aux cellules. On sait que l'adhérence aux cellules de l'hôte est due à des interactions protéiques parce qu'un traitement à la trypsine de *M. bovis* entraîne une perte partielle de celle-ci. Effectivement, un certain nombre de protéines ont été impliquées dans la cytoadhérence de *M. bovis*. La protéine membranaire P26 joue un rôle majeur dans l'adhérence de *M. bovis*, au moins aux cellules EBL. Aussi, l'alpha-enolase, une enzyme glycolytique membranaire induit l'adhérence aux EBL en fixant le plasminogène. Finalement, les protéines de surface hypervariables Vsps jouent aussi un rôle dans la cytoadhérence puisqu'elles se fixent sur les cellules de l'hôte et lorsque l'on prétraite ces cellules avec des Vsps purifiées on diminue de ce fait l'adhérence de *M. bovis* aux cellules.

En ce qui concerne l'adhérence chez les mycoplasmes du groupe mycoides, et donc *Mmm*, très peu de données sont à ce jour disponibles. Des auteurs ont comparé l'adhérence de différentes souches de *Mmm* à plusieurs types cellulaires bovins présents au niveau pulmonaire (Aye et al., 2015). Ils n'ont pas mis en évidence de différence notable entre les souches, y compris les souches vaccinales T1/44 et V5. Par contre, des différences significatives d'adhérence de ces souches à différentes cellules bovines ont été mises en évidence : adhérence plus élevée aux cellules épithéliales pulmonaires, adhérence moyenne aux cellules endothéliales et adhérence très basse aux fibroblastes et cellules respiratoires embryonnaires. A ce jour, aucune molécule d'adhérence n'a encore été démontrée pour les membres du groupe mycoides, même si les polysaccharides capsulaires pourraient être impliqués (Razin, 1985). Cette hypothèse est à nuancer suite aux dernières études qui montreraient, qu'au contraire, la présence de polysaccharide capsulaire diminue l'adhérence de *Mmm* au support inerte (Gaurivaud et al., 2014). Dans le même sens, il a été montré qu'un mutant de *Mmc* déficient en galactane présente une capacité d'adhésion aux cellules de l'hôte bien supérieure que la souche sauvage (Schieck et al., 2016)

I.2 Invasion cellulaire et persistance

I.2.1 Interaction avec les cellules non phagocytaires

Les mécanismes d'invasion et de persistance de *M. bovis* et *Mmm* ne sont pas bien connus. Dans leur environnement naturel, la variation des protéines de surface (Lysnyansky et al., 1999; Persson et al., 2002) et la formation de biofilms (McAuliffe et al., 2006, 2008) leur permettent de survivre et de persister mais les mécanismes d'invasion et persistance à l'intérieur des différentes cellules de l'hôte sont loin d'être élucidés. Chez *M. bovis* la localisation intracellulaire du mycoplasme vivant a été décrite après des infections réalisées *in vitro* dans différents types cellulaires comme les hépatocytes, les cellules épithéliales bronchiques et les cellules embryonnaires de cornets nasaux (PECT) (Bürki et al., 2015b, 2015a). Les images obtenues après infection des PECT par *M. bovis* à la MOI de 600 par microscopie électronique à transmission montre clairement la présence de mycoplasmes dans le cytoplasme (Bürki et al., 2015b). De plus les tests de protection aux antibiotiques ont montré que *M. bovis* était capable de survivre et de se multiplier dans ces cellules (Bürki et al., 2015b). Chez *M. agalactiae* (très proche phylogénétiquement de *M. bovis*), des expériences d'infection *in vitro* ont montré la capacité du mycoplasme à pénétrer dans les

cellules de la lignée épithéliale humaine HeLa, en plus des cellules hôtes classiques des ruminants (lignée d'endomètre bovine (BEND) et fibroblastes de poumons de buffles (BLF)) (Hegde et al., 2014). A la suite d'un traitement antibiotique, les mycoplasmes protégés à l'intérieur des cellules survivent et sortent dans un état viable, puis ils peuvent éventuellement re-coloniser l'environnement extracellulaire en absence de traitement antibiotique. En ce qui concerne *Mmm*, il n'y a à ce jour aucune donnée disponible sur la présence intracellulaire de ces mycoplasmes dans les cellules non phagocytaires.

1.2.2 Interaction avec les phagocytes

Les cellules immunitaires qui interagissent en premier avec les mycoplasmes sont les polynucléaires neutrophiles (PMN) et les macrophages. Ces cellules ont pour rôle d'éliminer le pathogène grâce notamment à leurs capacités phagocytaires. En présence d'anticorps spécifiques, ces cellules phagocytent efficacement les mycoplasmes, qui sont ensuite dégradés dans les phagosomes (Marshall et al., 1995). Dans le cas de *M. pulmonis*, la dégradation par les macrophages est partielle après deux heures et complète après 24 heures (Jones and Hirsch, 1971). Pour *M. bovis*, l'élimination par les neutrophiles est nettement plus efficace que par les macrophages mais strictement dépendante de la présence d'anticorps spécifiques de type IgG2 (Howard, 1984). Des infections expérimentales avec *M. bovis* réalisées chez des veaux ont montré la présence de mycoplasmes entiers (non dégradés) dans le cytoplasme des macrophages, ce qui suggère soit une résistance à la phagocytose, soit une relative incapacité des phagocytes à les éliminer (Kleinschmidt et al., 2013). Les infections *in vitro* avec la souche Mb1 de *M. bovis* ont révélé la présence des bactéries vivantes à l'intérieur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (van der Merwe et al., 2010). Cependant, seule une détection par immunofluorescence indirecte a été utilisée pour détecter les mycoplasmes dans chaque sous-type cellulaire, dont les monocytes font partie (environ 10% des PBMC), ce qui ne constitue pas une preuve de viabilité. Finalement, ce n'est que très récemment que Suleman et collaborateurs ont montré la présence et la survie de *M. bovis* dans les macrophages alvéolaires bovins (Suleman et al., 2016). Néanmoins, l'étude montre une grande disparité selon les isolats étudiés. Ainsi, certaines souches sont retrouvées vivantes à l'intérieur de 20% des macrophages 18 heures après l'infection, alors que d'autres souches n'ont pas été retrouvées intracellulairement.

En ce qui concerne *Mmm*, seule la présence d'antigènes dans le cytoplasme des macrophages d'animaux infectés a été démontrée (Scanziani et al., 1997), mais il n'y a aucune donnée disponible sur la survie potentielle de ce pathogène dans les phagocytes.

I.3 Objectifs

Les objectifs de ce chapitre de thèse étaient dans un premier temps d'utiliser les mycoplasmes fluorescents développés dans le chapitre 2 pour étudier et comparer les interactions entre *M. bovis* et *Mmm* et les macrophages bovins. Le choix des macrophages plutôt que celui des neutrophiles était motivé par la plus longue durée de vie des premiers *in vivo*, en effet, les neutrophiles survivent quelques jours alors que les macrophages peuvent survivre pendant des mois. Cette capacité à perdurer longtemps dans les tissus représente un intérêt évident pour la survie intracellulaire des mycoplasmes. Nous avons donc comparé la capacité de *M. bovis* et *Mmm* à survivre extra et intra cellulièrement en présence de macrophages. La survie de *M. bovis* dans les macrophages a déjà été observée *in vitro* 18 heures après infection mais il n'y a aucune étude sur ce sujet concernant *Mmm*. Si *M. bovis* et *Mmm* sont capables de survivre, voire de se multiplier et donc de persister plusieurs jours dans ces cellules, ceci pourrait constituer une niche pour le mycoplasme et un réservoir infectieux résistant aux traitements antibiotiques.

Dans un second temps, nous voulions démontrer que l'outil « mycoplasmes fluorescents » peut permettre de visualiser directement les différences en matière de capacité d'adhésion, invasion et prolifération des deux espèces de mycoplasmes pour un système cellulaire donné. Nous avons décidé, dans cette partie, de comparer l'adhésion et invasion des cellules EBL de nos souches *M. bovis* et *Mmm* pour pouvoir les comparer aux données de la littérature.

II Résultats et discussion

II.1 Etude de la survie des mycoplasmes en présence de macrophages dérivés de monocytes bovins *in vitro*

II.1.1 Evaluation de la cytométrie en flux pour l'analyse de la cinétique d'infection des macrophages par les mycoplasmes

Dans le chapitre précédent nous avons démontré que les mycoplasmes fluorescents peuvent être utilisés avec succès dans les analyses d'interactions cellulaires. Nous avons

choisi d'utiliser les clones mNeonGreen N6 de *Mmm* Rita et N8 de *M. bovis* Oger2 afin de réaliser des infections *in vitro* de macrophages bovins dérivés des monocytes sanguins. Ces clones ont pu être identifiés à l'intérieur des cellules par cytométrie en flux et microscopie confocale à une forte MOI (200) et après 30 minutes de contact. Alors, nous avons voulu tester les limites de détection de ces méthodes pour évaluer leur champ d'application possible. Nous voulions notamment vérifier si nous pouvions utiliser la cytométrie en flux pour quantifier le pourcentage de macrophages infectés par les mycoplasmes. Cette technique faciliterait énormément les expériences de cinétique d'infection, classiquement basées sur le titrage d'UFC. En effet, la technique de titrage de mycoplasmes sur gélose est laborieuse et longue, puisqu'il faut attendre plusieurs jours avant de pouvoir compter les colonies. De plus, elle est peu reproductible quand il s'agit de bactéries agrégées ou associées aux cellules, qui sont difficilement individualisables. Finalement, elle doit être associée à des traitements antibiotiques efficaces pour permettre la quantification des mycoplasmes présents à l'intérieur des cellules par rapport à ceux qui se trouvent à l'extérieur (test de protection aux antibiotiques). Néanmoins, cette technique est très simple et permet d'avoir des résultats relativement quantitatifs.

Nous avons donc réalisé une cinétique d'infection des macrophages à 30 minutes et 18 et 72 heures. Pour cela, nous avons mis en contact des macrophages bovins et des mycoplasmes pendant 30 minutes, puis nous avons enlevé l'inoculum avec tous les mycoplasmes qui n'avaient pas adhéré ou étaient restés en suspension et remis du milieu de culture afin de poursuivre l'infection pour les analyses à 18 et 72 heures post-infection. A chaque point de la cinétique les puits ont été lavés afin de retirer tout ce qui était en suspension et nous avons récupéré les cellules par grattage avant analyse par cytométrie en flux et titrage classique sur gélose. Avant titrage, les cellules ont été passées au travers d'une aiguille 25G à l'aide d'une seringue pour lyser les cellules et homogénéiser les titrages. De plus, nous avons infecté les macrophages soit avec les souches sauvages, soit avec les mutants fluorescents de *Mmm* et *M. bovis* pour comparer leurs capacités d'invasion et persistance respectives.

Les résultats pour *M. bovis* en cytométrie en flux sont illustrés dans la **figure 28**. Des résultats similaires ont été obtenus pour *Mmm* (résultats non montrés). Les résultats des titrages correspondants sont retranscrits dans l'**Annexe 5** et illustrés en **Figure 29**. Cette expérience nous a permis de montrer que le titrage était, dans ses conditions, beaucoup plus sensible que la cytométrie. En effet, la cytométrie après 18 et 72 heures d'infection ne

permet de détecter que peu (13%) ou pas du tout (0%) de cellules positives, alors que le titrage réalisé en parallèle donne un titre de 10^5 UFC/mL. L'utilisation de la cytométrie en flux pour une étude de survie en cinétique ne semble pas adaptée à cause des limites de détection pas assez sensibles. En conséquence, la suite des analyses quantitatives se fera par titrage classique. De plus, nous avons vérifié que les résultats des titrages sont équivalents indépendamment de la présence de marqueurs fluorescents. En effet, les souches fluorescentes se comportent comme leurs souches sauvages respectives. Les souches sauvages et les mutants seront donc utilisés indistinctement dans les analyses suivantes.

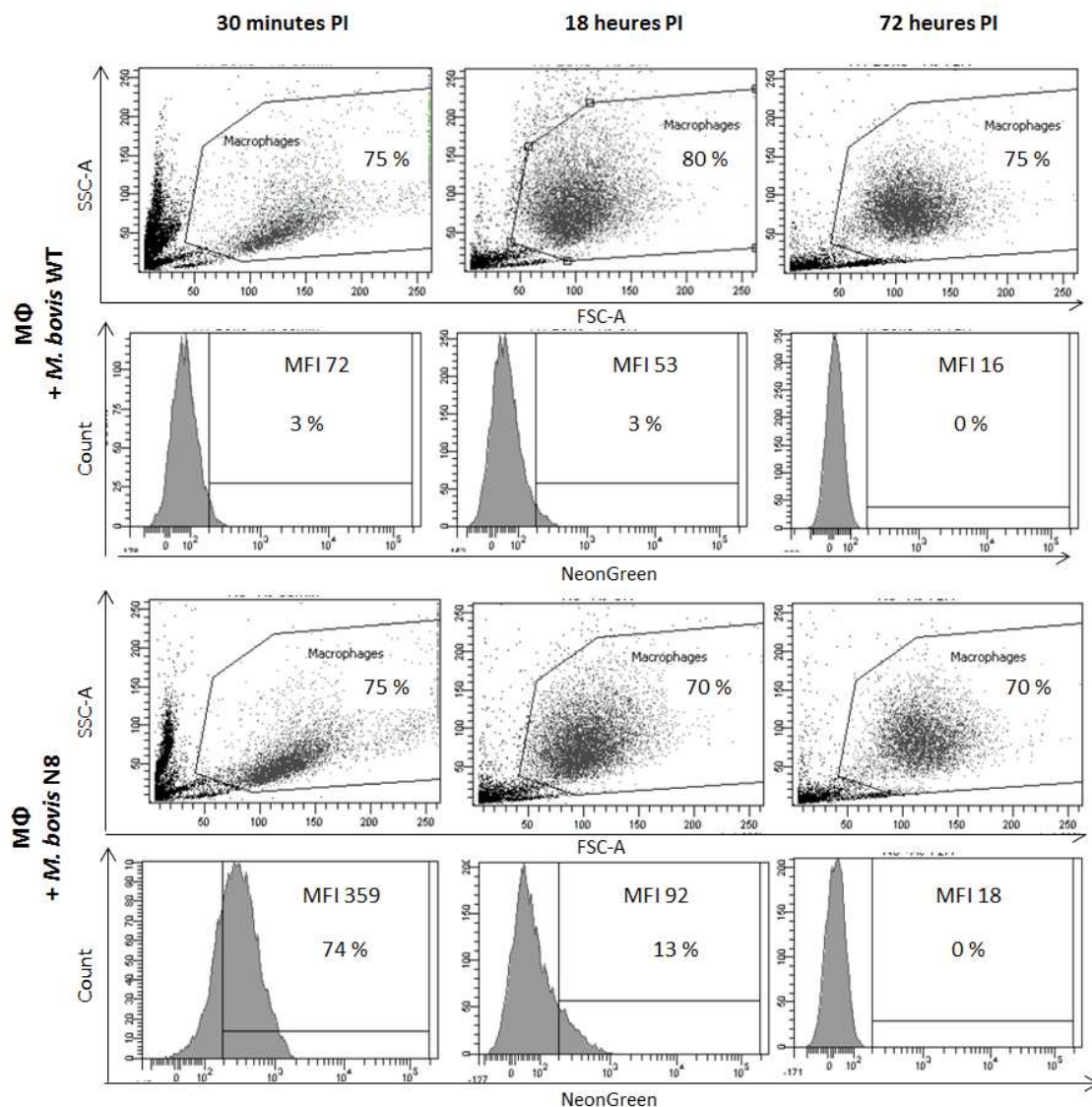


Figure 28 : Analyse en cinétique de la présence de mycoplasmes associés aux macrophages bovins par cytométrie en flux. Les macrophages bovins (MΦ) ont été infectés durant 30 minutes avec *M. bovis* souche sauvage (WT) ou exprimant mNeonGreen (N8) à une MOI 10000. L'inoculum a été alors retiré et l'incubation s'est poursuivie pendant 18 et 72 heures. Les macrophages ont été analysés après grattage du contenu des puits préalablement lavés à 30 minutes, 18 heures ou 72 heures post-infection (PI). La ligne du haut présente la morphologie de la population (FSC vs SSC) et celle du bas un histogramme quantitatif du nombre de macrophages en fonction de l'intensité de fluorescence. MFI : médiane des intensités de fluorescence.

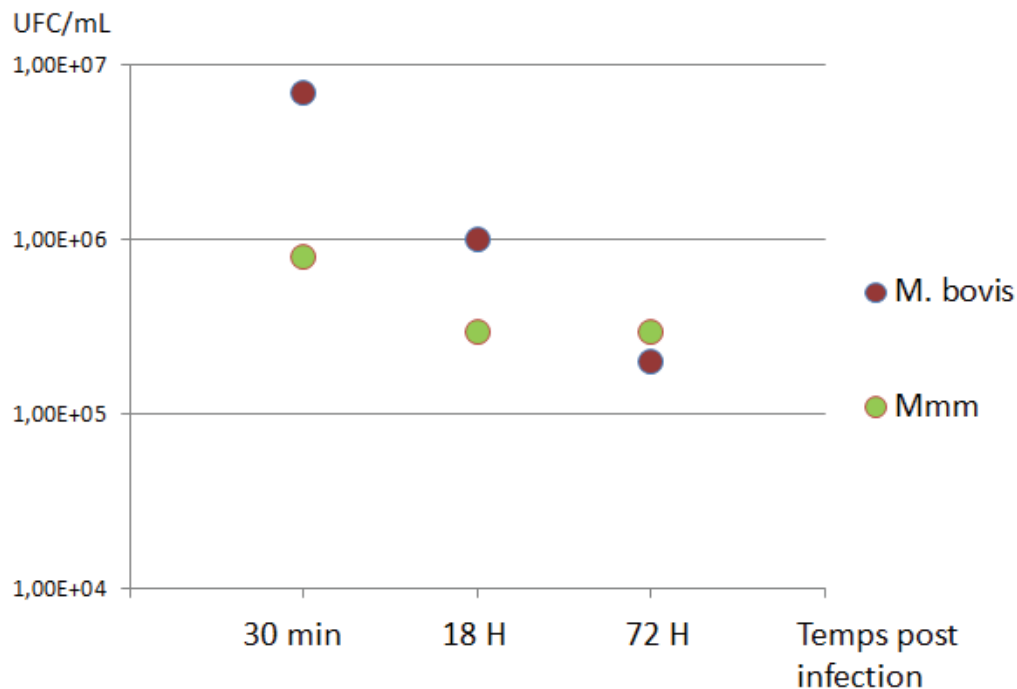


Figure 29 : Quantification de mycoplasmes vivants au cours du temps en présence de macrophages bovins. Les macrophages bovins (MΦ) ont été infectés durant 30 minutes avec *M. bovis* Oger2 ou *Mmm* Rita souche sauvage (WT) ou exprimant mNeonGreen (N8 ou N6 respectivement) à une MOI de 10000 pour *M. bovis* et 1000 pour *Mmm*. L'inoculum a été alors retiré et l'incubation a poursuivie pendant 18 et 72 heures. Les titrages ont été réalisés après grattage du contenu des puits préalablement lavés à 30 minutes, 18 heures et 72 heures post-infection. L'histogramme représente le titre moyen mesuré à différent temps post infection chez les souches fluorescentes et leurs souches sauvages respectives.

Pour pouvoir utiliser la cytométrie en flux en étant plus sensible, il faudrait optimiser les longueurs d'onde. Aucun laser disponible pour les cytomètre ne permet d'exciter de façon optimale mNeonGreen mais on peut jouer sur la longueur d'onde d'émission en utilisant des filtres plus adéquats dont nous ne disposons pas actuellement au laboratoire. Lors de l'acquisition de la fluorescence en microscopie confocale, nous pouvons régler la longueur d'onde plus finement afin de récupérer plus de signal que sur le cytomètre ce qui peut expliquer en partie la différence de sensibilité. De plus les macrophages possèdent leur propre auto fluorescence qu'il est plus facile d'éliminer dans les réglages en microscopie qu'en cytométrie.

II.1.2 Effet dose sur la survie des mycoplasmes sous forme adhérente après lavage

Par la suite, nous avons choisi de tester différentes MOI pour analyser l'effet de la quantité de mycoplasmes sur la capacité des macrophages à éliminer le pathogène. En effet, nous ne voulions pas travailler dans des conditions saturantes pour les macrophages. De plus, puisque nous avons effectué les titrages après lavage afin d'éliminer les mycoplasmes

non adhérents, il était également important de vérifier les capacités d'adhérence de nos mycoplasmes modèles, que ce soit au support de culture ou aux macrophages eux-mêmes.

Nous avons donc réalisé une première expérience en mettant en contact des souches sauvages de mycoplasmes (*M. bovis* Oger2 ou *Mmm* Rita), préalablement lavées, avec des macrophages bovins en utilisant différentes MOI comprises entre environ 2-5 ; 20-50 et 200-500. Ces MOI nous paraissaient intéressantes car elles pouvaient refléter différents niveaux d'infection.

Nous avons choisi de travailler avec du sérum de veau décomplémenté, puisque nous voulions nous placer dans le cas d'une primo infection. De plus, l'étude qui apporte, pour la première fois, la preuve de la persistance de *M. bovis* vivants dans des macrophages alvéolaires bovins a été réalisée dans ces conditions (Suleman et al., 2016). Les mycoplasmes peuvent donc rentrer de façon active ou passive dans les macrophages via la phagocytose ou via une internalisation après reconnaissance, par exemple, des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par les récepteurs PRR (Pathogen Recognition Receptors) du macrophage (Espinosa and Chillet, 2010).

Comme précédemment, après les 30 minutes d'incubation nous avons retiré l'inoculum, puis nous avons laissé poursuivre l'infection jusqu'à 4 ou 72 heures. Les puits ont aussi été lavés afin de retirer tout ce qui était en suspension avant grattage et lyse mécanique des cellules pour titrage. Les résultats de deux expériences distinctes avec des MOI équivalentes sont renseignés dans l'**annexe 6** et illustrés en **figure 30 et 31**.

Les résultats des titrages obtenus en **figure 30** montrent un effet dose marqué sur la quantité de *M. bovis* adhérents après 4 heures de contact et d'infection. Le nombre de mycoplasmes retrouvés dans les puits est proportionnel à la quantité présente dans l'inoculum de départ. Cependant, au bout de 72 heures on ne retrouve plus cet effet dose. En effet, pour les MOI les plus faibles (5 et 50) on note une augmentation du titre par rapport au titre obtenu à 4h, alors qu'à la MOI de 500 une baisse est observée. Nous pouvons conclure de ces résultats que *M. bovis* n'est pas éliminé par les macrophages même à la MOI la plus faible.

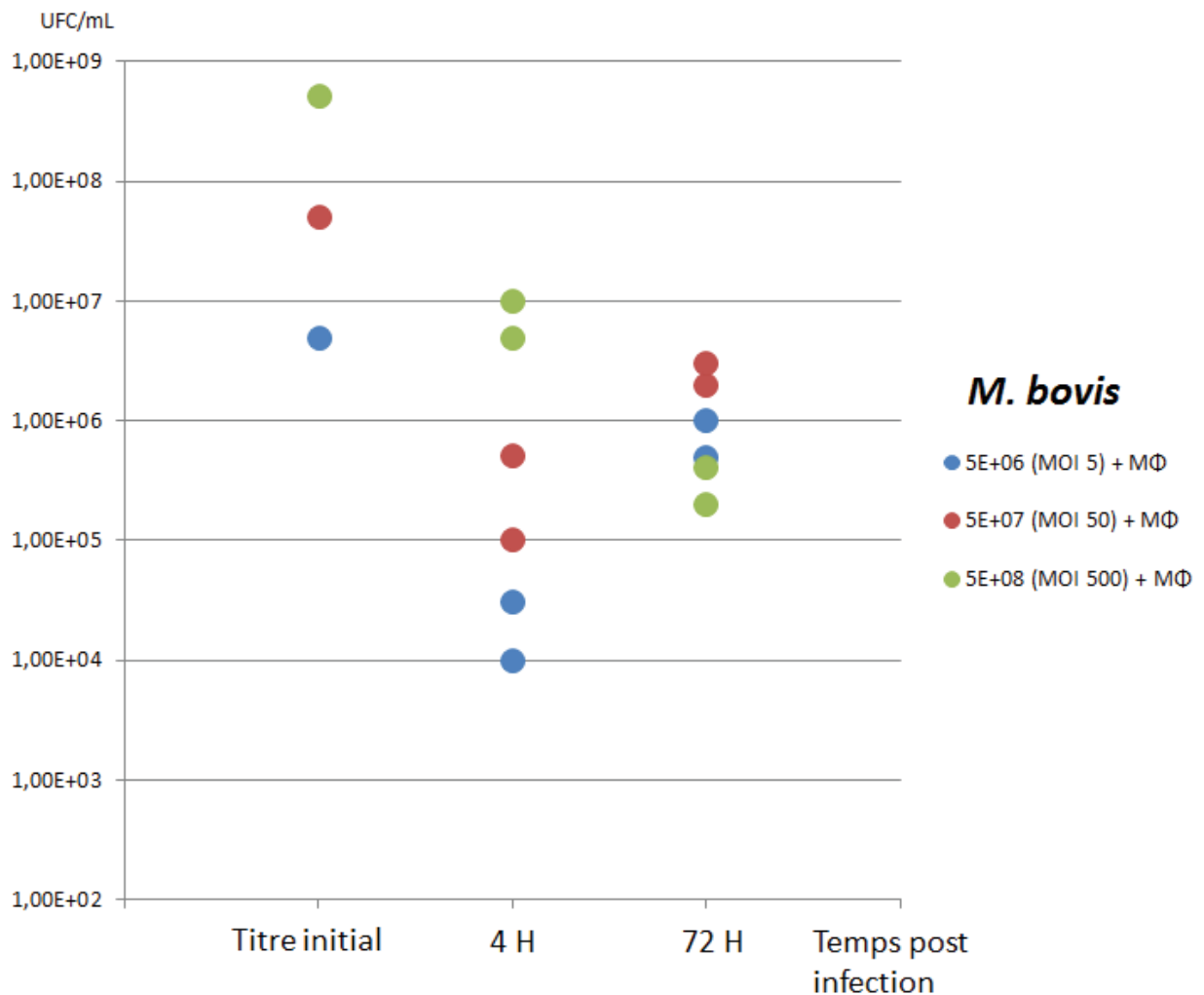


Figure 30 : Effet dose sur la survie *in vitro* et sous forme fixée de *M. bovis* Oger2 en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ). Les mycoplasmes ont été ajoutés à 10^6 macrophages à différentes MOI durant 30 minutes, puis l'inoculum a été retiré et l'incubation poursuivie pendant 4 et 72 heures. Les résultats présentés sont les valeurs des titrages en UFC/mL après grattage et passage à la seringue du contenu des puits préalablement lavés de deux expériences. Ne sont quantifiés que les mycoplasmes associés soit au support plastique soit aux macrophages (intra et extra cellulièrement).

La **figure 31** montre des résultats très contrastés pour *Mmm*. En effet, on ne retrouve pas d'effet dose après 4 heures d'incubation avec les cellules. Après 72 heures d'infection on observe une chute du titre infectieux importante pour toutes les conditions ; jusqu'à 2 logs pour la MOI de 2.

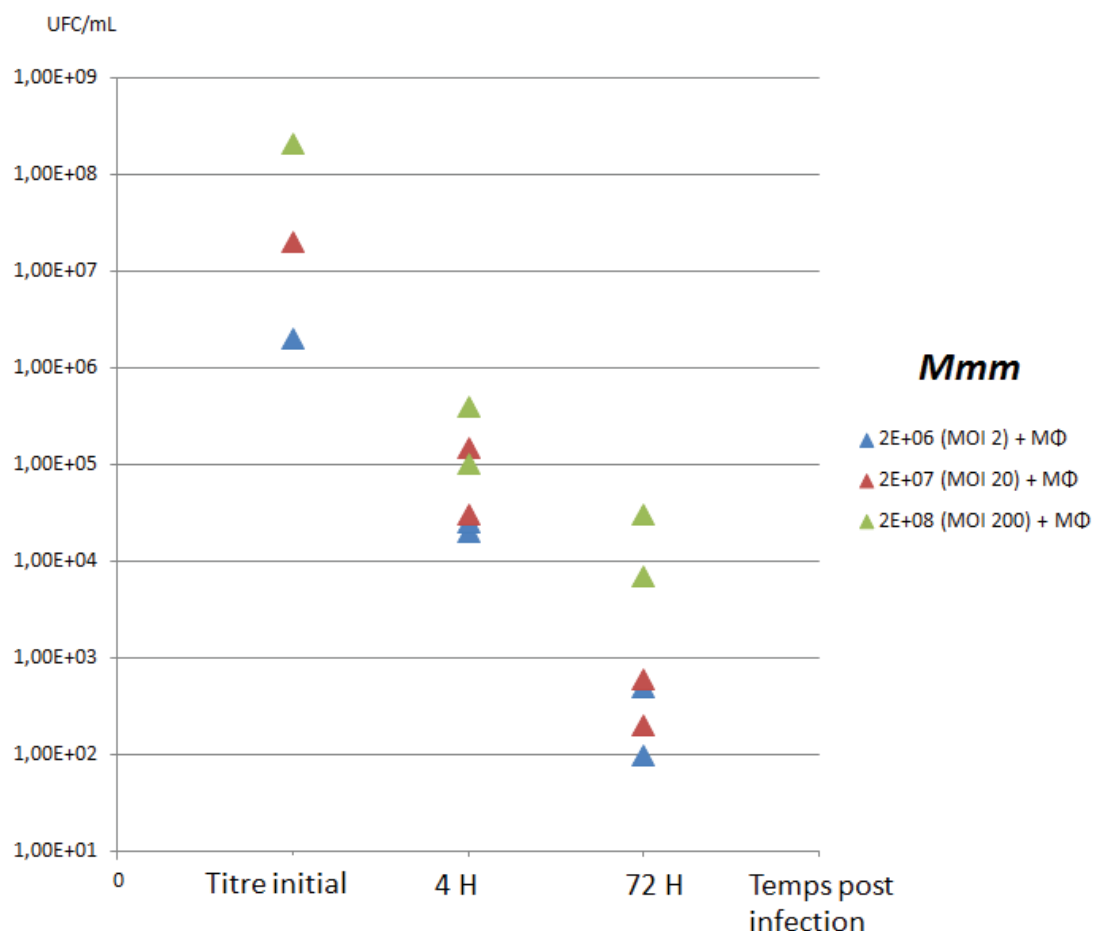


Figure 31 : Effet dose sur la survie *in vitro* et sous forme fixée de *Mmm* Rita en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ). Les mycoplasmes ont été ajoutés à 10^6 macrophages à différentes MOI durant 30 minutes, puis l'inoculum a été retiré et l'incubation poursuivie pendant 4 et 72 heures. Les résultats présentés sont les valeurs des titrages en UFC/mL après grattage et passage à la seringue du contenu des puits préalablement lavés de deux expériences. Ne sont quantifiés que les mycoplasmes associés soit au support plastique soit aux macrophages (intra et extra cellulièrement).

La différence significative de capacité de survie sous forme fixée entre nos deux espèces modèles nous a amené à réaliser une expérience complémentaire sans cellules. Nous voulions en effet comparer la capacité des deux espèces de mycoplasmes à se fixer tout d'abord au support plastique inerte utilisé en culture cellulaire. De plus, nous voulions connaître l'impact du lavage des puits avant le titrage pour nos deux mycoplasmes modèles. Pour ce faire, nous avons réalisé une expérience similaire à la précédente avec quelques modifications. Tout d'abord, nous avons laissé l'inoculum de départ jusqu'à la fin de la période d'incubation choisie pour suivre son titre tout le long de l'expérience. Ensuite, nous avons lavé ou non les puits avant les titrages (cette dernière condition dans le but de quantifier tous les mycoplasmes viables présents dans les puits, fixés ou non). L'objectif de cette expérience était de vérifier l'effet de l'adhérence/fixation sur la survie des mycoplasmes. Les résultats sont présentés dans la **table 12**.

a <i>M. bovis</i> Titre initial (UFC/mL)	4H post infection UFC/mL		Variation ratio entre titre initial et titre à 4h PI		72H post infection UFC/mL		Variation ratio entre titre initial et titre à 72h PI		Variation ratio entre titre à 4h et titre à 72h PI	
	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages
5E+07	8E+05	2E+07	÷ 60	÷ 2	1E+04	2E+07	÷ 5000	÷ 2	÷ 80	=

b <i>Mmm</i> Titre initial (UFC/mL)	4H post infection UFC/mL		Variation ratio entre titre initial et titre à 4h PI		72H post infection UFC/mL		Variation ratio entre titre initial et titre à 72h PI		Variation ratio entre titre à 4h et titre à 72h PI	
	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages	+ lavages	- lavages
2E+07	1E+04	2E+07	÷ 2000	=	<5E+01	5E+06	÷ 400000	÷ 4	÷ 200	÷ 4

Table 12 : Quantification des mycoplasmes cultivés seuls au cours du temps avec ou sans lavages avant titrage. Les mycoplasmes *M. bovis* Oger2 (rose) et *Mmm* Rita (vert) ont été ajoutés aux puits vides à un titre de $5 \cdot 10^7$ UFC/mL (*M. bovis*) et $2 \cdot 10^7$ UFC/mL (*Mmm*) durant 30 minutes, puis du milieu neuf a été ajouté et l'incubation s'est poursuivie pendant 4 ou 72 heures. Les résultats présentés sont les valeurs des titrages en UFC/mL après grattage des puits avec ou sans lavages préalables, correspondant uniquement aux mycoplasmes adhérents (avec lavage) ou incluant aussi ceux en suspension (sans lavage).

D'après les résultats de la **table 12**, il est clair qu'en l'absence de lavage et de retrait de l'inoculum, *Mmm* est capable de survivre jusqu'à 3 jours dans le milieu de culture sans cellule, quasiment aussi bien que *M. bovis*. Par contre, après retrait de l'inoculum et lavages, comme prévu, les titres chutent pour les deux mycoplasmes. Cependant, on constate après 4 heures de culture que *M. bovis* adhère mieux que *Mmm* (différence de 2 log). En effet après 4 heures d'incubation et des lavages on récupère 1,6% des mycoplasmes présents dans l'inoculum de départ pour *M. bovis* et seulement 0,05% pour *Mmm*. Après 3 jours de culture la différence entre les deux espèces de mycoplasmes en termes de capacité de fixation est toujours d'au moins 2 log. Le titre pour *M. bovis* chute de 3 log par rapport au titre initial alors que celui de *Mmm* chute à minima de 5 log.

Ces résultats nous permettent de conclure que *M. bovis* adhère mieux au plastique que *Mmm*, et ce même après 3 jours de culture. Ceci peut expliquer en partie le taux supérieur de survie de *M. bovis* par rapport à *Mmm* observé précédemment après 3 jours en présence de macrophages (**figure 30 et 31**). Mais il y a apparemment aussi un effet important associé à la présence de macrophages puisque, à concentrations égales, $5 \cdot 10^7$ UFC/mL, le titre à 72 heures en présence de macrophages est supérieur de 2 log au titre en l'absence de macrophages. Ceci est également valable pour *Mmm* à une concentration de $2 \cdot 10^7$ UFC/mL.

II.1.3 Effet dose sur la survie des mycoplasmes sous forme fixée et en suspension

Le but de cette expérience était de comparer la capacité de survie de *M. bovis* et *Mmm* en présence de macrophages mais sans les biais introduits par le retrait de l'inoculum et les lavages avant récolte. Cette fois-ci, les souches fluorescentes Rita N6 de *Mmm* et Oger2 N8 de *M. bovis* ont été utilisées pour permettre des analyses en parallèle par microscopie confocale (cf section II.1.5).

Nous avons donc mis en contact des macrophages bovins avec les mycoplasmes à deux MOI (5 et 50) pendant 30 minutes, puis nous avons rajouté du milieu complet sans enlever l'inoculum et nous avons laissé l'infection se poursuivre pendant 4 ou 72 heures. Lorsque l'infection était terminée (après 4 ou 72 heures), les cellules ont été récupérées par grattage et lysées à la seringue avant d'être titrées. L'expérience a été reproduite deux fois et les résultats sont illustrés dans les **figure 32** et compilés dans l'**annexe 7**.

Tout d'abord, il est important de rappeler que dans ces mêmes conditions de culture mais en l'absence de macrophages, *M. bovis* et *Mmm* sont capables de survivre tous les deux après 3 jours d'incubation, avec un titre comparable au titre de départ (**table 12**).

Les résultats présentés dans les **figure 32** indiquent qu'en présence de macrophages il y a, pendant les premières 4h d'incubation, une prolifération comparable des deux mycoplasmes (soit environ 1 log de plus que le titre de départ). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les mycoplasmes sont capables de se répliquer plus vite qu'ils ne sont éliminés.

Après 72 heures d'incubation pour *M. bovis* on peut constater une perte d'environ 1 à 2 log de titre infectieux aux MOI de 5 et 50 par rapport aux titres mesurés à 4h (**figure 32a**). Les macrophages ont, semble-t-il, joué leur rôle de phagocytes sans pour autant éliminer tous les mycoplasmes, le titre restant étant très important ($>10^6$ UFC/mL). Lorsque l'on compare ces résultats avec ceux obtenus chez *Mmm* dans la **figure 32b** on observe également une chute du titre entre 4h et 72h mais avec une différence importante à la MOI la plus faible. En effet, dans ce cas, le titre chute de 3 à 4 log pour *Mmm* comparé à environ 1-2 log pour *M. bovis*. Comme observé précédemment (**figure 31**), *Mmm* est nettement moins persistant au cours du temps que *M. bovis* aux MOI faibles.

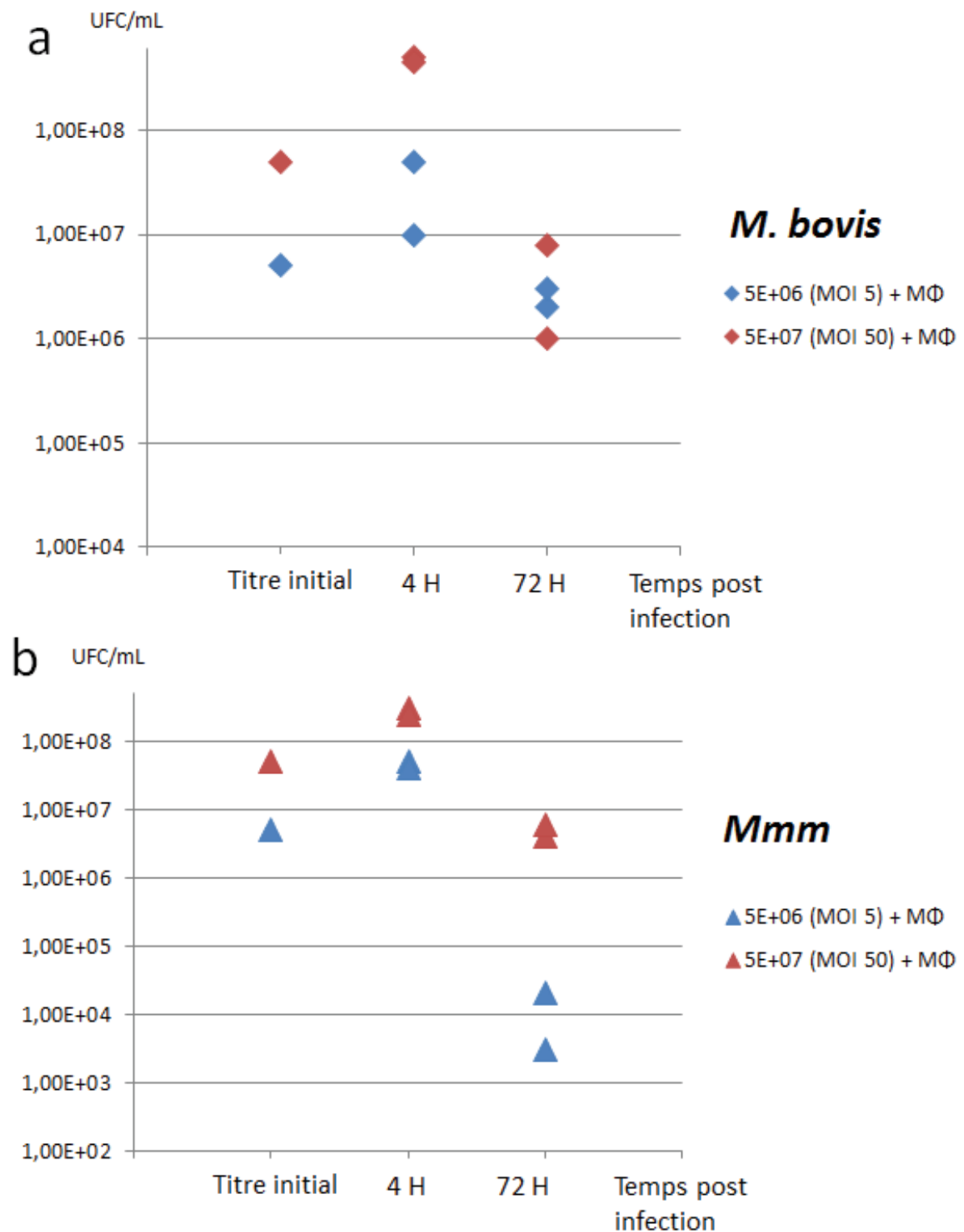


Figure 32: Effet dose sur la survie *in vitro* de *M. bovis* Oger2 N8 (a) et de *Mmm* Rita N6 (b) en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ). Les mycoplasmes ont été ajoutés à $1 \cdot 10^6$ macrophages à différentes MOI durant 30 minutes, puis du milieu a été rajouté sans enlever l'inoculum et l'incubation s'est poursuivie pendant 4 ou 72 heures. Les résultats présentés (correspondant à deux expériences) sont les valeurs des titrages en UFC/mL obtenues après grattage et passage à la seringue du contenu des puits non lavés. Sont quantifiés la totalité des mycoplasmes vivants présents dans les puits de culture (adhéré et en suspension). Résultats obtenus dans deux expériences indépendantes.

Dans ces conditions expérimentales où les mycoplasmes sont en présence de macrophages la chute du titre peut s'expliquer par une phagocytose efficace suivie de l'élimination des mycoplasmes. Néanmoins, nous avons démontré que les mycoplasmes se répliquent d'une part et qu'ils sont aussi phagocytés par les macrophages d'autre part. En effet, il peut y avoir une certaine balance entre la réplication et l'élimination de ces mycoplasmes. Ce que l'on peut conclure c'est que, même à une MOI faible de 5, les macrophages ne parviennent pas à éliminer complètement l'infection.

Nous avons montré une persistance des mycoplasmes au contact des macrophages durant 3 jours, et ce même pour une faible MOI. La majorité des mycoplasmes vivants semblent extracellulaires et non fixés pour *Mmm*, alors que *M. bovis* semble adhérer fortement au support (cellules et plastique). Il reste cependant une proportion faible de *Mmm* survivants et fort probablement associés aux cellules. Ces résultats nous incitent donc à poursuivre les travaux dans le but de déterminer s'il y a une survie intracellulaire de ces deux mycoplasmes dans les macrophages.

II.1.4 Test de protection aux antibiotiques pour analyser la survie des mycoplasmes à l'intérieur des macrophages.

Pour déterminer la survie intracellulaire d'un organisme pathogène, on réalise généralement un test de protection aux antibiotiques. Classiquement, ces tests de protection chez les mycoplasmes sont réalisés avec la gentamicine à 400 µg/mL (dose bactéricide) durant 3 heures à 37°C pour tuer tous les mycoplasmes extracellulaires. Ensuite, on lave les cellules afin d'éliminer toute trace résiduelle d'antibiotique qui pourrait être bactériostatique et donc biaiser le titrage.

Les souches sauvages modèles que nous avons sélectionnées pour nos études, Rita chez *Mmm* et Oger2 chez *M. bovis*, sont deux souches virulentes isolées directement de cas cliniques. Leur résistance aux antibiotiques n'avait pas été évaluée. Nous avons donc testé les conditions standards utilisées chez les mycoplasmes, et notre souche de *M. bovis* était sensible à la gentamicine alors que celle de *Mmm* non. L'effet bactéricide de la gentamicine a été évalué après 3 heures d'incubation à 3 doses différentes (**Table 13**).

concentration de gentamicine $\mu\text{g/mL}$	250	500	1000	Contrôle positif
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+
<i>Mmm</i>	+	+	+	+

Table 13 : Détermination de la dose bactéricide de gentamicine pour *M. bovis* Oger2et *Mmm* Rita en milieu PPLO. Entre 1 et 5. 10^8 UFC/ml de chaque mycoplasme sont traitées pendant trois heures avec différentes doses ($\mu\text{g/mL}$) de gentamicine dans 500 μl de milieu PPLO dans des microtubes. Après trois heures d'incubation à 37°C, une dilution d'un facteur 500x est réalisée à partir de chaque tube dans un volume final de 2 ml de milieu. La présence (+) ou absence (-) d'un trouble dans les tubes est vérifiée sept jours après incubation à 37°C. Les contrôles positifs sont en fait des contrôles d'absence de concentration résiduelle bactériostatique de gentamicine après la dilution 500x. Ils sont constitués d'une dilution 500x faite à partir des tubes contenant 1000 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicine auxquels on rajoute chacun des mycoplasmes à environ 10^7 UFC/mL.

Il est important de souligner que les conditions de culture lors des expériences d'interaction entre les macrophages et les mycoplasmes et les conditions standards de culture des mycoplasmes ne sont pas identiques. Nous avons donc réalisé des tests de résistance aux antibiotiques des mycoplasmes dans les conditions de culture des macrophages (milieu et support de culture adaptés) pour vérifier que ces conditions ne modifient pas la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Après avoir déposé l'inoculum dans nos puits durant 30 minutes, puis rajouté du milieu de culture pour macrophages, nous avons laissé poursuivre l'incubation 4 heures ou 3 jours. Après ce temps, nous avons ajouté ou non la gentamicine à une concentration finale de 1 mg/mL pendant 3 heures. Ensuite, les puits ont été lavés quatre fois avec du PBS pour ne pas fausser le résultat du titrage à cause de résidus d'antibiotiques. Les résultats de deux expériences distinctes sont résumés dans la **Table 14**.

Nous pouvons voir dans la **table 14** que la gentamicine, même à 1 mg/mL, n'est pas bactéricide dans les conditions de culture cellulaire. Ce résultat était attendu pour *Mmm* mais est très surprenant pour *M. bovis*. Pour les deux mycoplasmes, les puits avec et sans gentamicine ont des titres équivalents pour les deux concentrations après 3 heures, et bien qu'il y ait un effet de la gentamicine à 72h, il n'est que partiel. L'utilisation de la gentamicine dans nos conditions de culture avec nos souches sauvages pour un test de protection dans les macrophages est donc impossible.

a	<i>M. bovis</i>	4H post infection		72H post infection	
		UFC/mL		UFC/mL	
		Titre initial (UFC/mL)			
5E+06		5E+06	1E+06	1E+05	3E+05
5E+07		5E+07	1E+06	6E+05	5E+06
5E+06 + gentamicine 1 mg/mL		4E+06	1E+06	1E+04	1E+04
5E+07 + gentamicine 1 mg/mL		5E+06	8E+05	5E+03	5E+03

b	<i>Mmm</i>	4H post infection		72H post infection	
		UFC/mL		UFC/mL	
		Titre initial (UFC/mL)			
2E+06		4E+06	3E+06	5E+02	1E+03
2E+07		4E+06	4E+06	2E+04	1E+04
2E+06 + gentamicine 1 mg/mL		4E+06	3E+06	4E+02	2E+02
2E+07 + gentamicine 1 mg/mL		4E+06	4E+06	6E+03	5E+03

Table 14: Effet des antibiotiques sur les mycoplasmes seuls dans les conditions de culture cellulaire. Les mycoplasmes ont été ajoutés aux puits traités pour la culture cellulaire sans cellules à différentes concentrations durant 30 minutes, puis du milieu neuf a été ajouté et l'incubation s'est poursuivie pendant 4 ou 72 heures. Après ce temps, les puits ont été traités ou non avec la gentamicine à 1 mg/mL durant 3 heures à 37°C. Les résultats présentés correspondant à une expérience réalisée en duplicat, sont les valeurs des titrages en UFC/mL après grattage des puits préalablement lavés. Ne sont quantifiés que les mycoplasmes adhérents

II.1.5 Utilisation de la microscopie confocale pour l'étude des interactions entre *M. bovis* et *Mmm* et les macrophages bovins

Les analyses quantitatives par titrage des deux expériences indépendantes présentées en **figure 32** ont été complétées et illustrées par des analyses en microscopie confocale réalisées en parallèle. Pour ces analyses, nous avons rajouté des infections à une MOI de 500 (en plus des MOI de 5 et 50) pour maximiser les chances de visualiser des mycoplasmes à l'intérieur des cellules. En effet, pour des raisons techniques, nous avons choisi des photos représentatives permettant d'illustrer un seul plan focal pour ces analyses. Dans ces conditions, la microscopie confocale est peu sensible, surtout dans la mesure où il y a peu ou pas de foyers de mycoplasmes, mais une majorité de mycoplasmes individuels (avec des MOI faibles). Par conséquent, l'absence de mycoplasmes fluorescents sur les images ne signifie pas qu'il n'y ait pas des cellules infectées. Nous avons choisi de présenter

une image représentative de chaque puits de culture et pas de démontrer à chaque temps de la cinétique la présence de mycoplasmes.

De plus, nous avons ajouté une condition de culture avec des doses bactériostatiques d'antibiotique pendant toute la cinétique d'infection pour limiter l'effet de la multiplication des mycoplasmes. Pour cela, nous avons besoin de sélectionner un antibiotique efficace. Les souches fluorescentes N6 de *Mmm* Rita et N8 de *M. bovis* Oger2 ont été obtenues après transformation avec un plasposon, qui les rend résistants à la gentamicine. L'utilisation de cet antibiotique n'était donc pas possible avec les souches fluorescentes. Nous avons testé un autre antibiotique, la tilmicosine, à 5, 10 et 50 µg/mL pendant 3 heures en milieu PPLO, puis validé sur plaque de culture cellulaire. Le choix de cet antibiotique a été motivé par une étude montrant cet antibiotique comme très efficace chez *Mmm* (Ayling et al., 2005). Par contre il faut prendre en compte que cet antibiotique diffuse également à l'intérieur des cellules. La tilmicosine s'est avérée bactériostatique chez *M. bovis* à partir de 10 µg/mL et chez *Mmm* à partir de 5 µg/mL. L'effet cytotoxique sur les macrophages de la tilmicosine a aussi été évalué et il s'avère que trois jours d'incubation à la dose de 10 µg/mL est sans conséquence pour les cellules. Ces résultats non montrés ici sont basés d'une part sur l'étude de la morphologie cellulaire et d'autre part sur la viabilité cellulaire après ajout d'iodure de propidium et analyse en cytométrie de flux. Cette concentration de tilmicosine en condition de culture pour les macrophages est complètement bactériostatique pour *Mmm*, mais l'est uniquement partiellement pour *M. bovis*.

Des infections de macrophages bovins dérivés de monocytes ont donc été réalisées comme indiqué précédemment (section II.1.3) et nous avons observé les cellules infectées ou non au microscope confocal à 4, 24, 48 et 72 heures post infection. Nous avons ajouté pour les deux espèces des puits avec de la tilmicosine à 10 µg/mL pendant toute la durée de l'infection pour analyse à 4h et 72h. Pour *M. bovis* l'utilisation de l'antibiotique permet de ralentir la prolifération bactérienne (effet bactériostatique partiel) et pour *Mmm* cette dose d'antibiotique à un effet bactériostatique total, intra et extra cellulaire.

L'infection des macrophages avec le clone fluorescent N8 de *M. bovis* Oger2 (**figures 33 et 34**) montre que la proportion de cellules infectées augmente proportionnellement en fonction de la MOI utilisée. En effet, les cellules infectées à la MOI de 500 sont globalement toutes infectées avec beaucoup de mycoplasmes (foyers), et ce quel que soit le temps post infection, y compris en présence d'antibiotique. Pour les MOI faibles, on peut noter que peu

de cellules sont infectées pendant toute la durée post infection. De plus, la répartition des mycoplasmes par rapport aux cellules ne semble pas homogène : les macrophages infectés contiennent souvent plusieurs mycoplasmes ou foyers de mycoplasmes, alors que sur des cellules voisines, on ne visualise aucun mycoplasme dans le plan focal analysé.

La quantité de mycoplasmes que l'on retrouve dans les macrophages après 72 heures d'infection en présence ou en absence d'antibiotique à une MOI de 500 paraît supérieure à la quantité observée à 4 heures. Ceci suggère que les macrophages ne sont pas en mesure d'endiguer l'infection et que les mycoplasmes prolifèrent, même en présence de la tilmicosine, qui n'est pas très efficace pour *M. bovis*. Pour les MOI faibles on ne peut pas faire la même analyse par manque de sensibilité de la méthode mais des mycoplasmes fluorescents sont aussi observés à l'intérieur des cellules à la fin de l'incubation avec ou sans tilmicosine. La très faible quantité de mycoplasmes observés à ces MOI à 72 heures est en accord avec les résultats de titrage sur ces mêmes expériences (**figure 32**). En effet, les titres correspondent à maximum 10 mycoplasmes par cellule, et cela avant lavage. Les macrophages sont donc capables de contenir l'infection sans pour autant éliminer entièrement les mycoplasmes. De plus, les mycoplasmes intracellulaires observés à 72 heures post infection sont toujours fluorescents, ce qui signifie qu'ils sont vivants ou morts depuis très peu de temps.

En effet, nous avons vérifié dans le chapitre précédent que les mycoplasmes tués à la chaleur n'émettaient plus de fluorescence détectable 3 heures après avoir été tués. Ces résultats sont en accord avec le fait que des antigènes ont été détectés par les anticorps monoclonaux et que la survie à long terme de *M. bovis* a déjà été montrée *in vivo* dans les phagocytes (Khodakaram-Tafti and López, 2004; Kleinschmidt et al., 2013). La survie de *M. bovis* dans les phagocytes met en évidence une persistance intracellulaire qui serait probablement liée à une altération des mécanismes de dégradation qui suivent la phagocytose (Kleinschmidt et al., 2013).

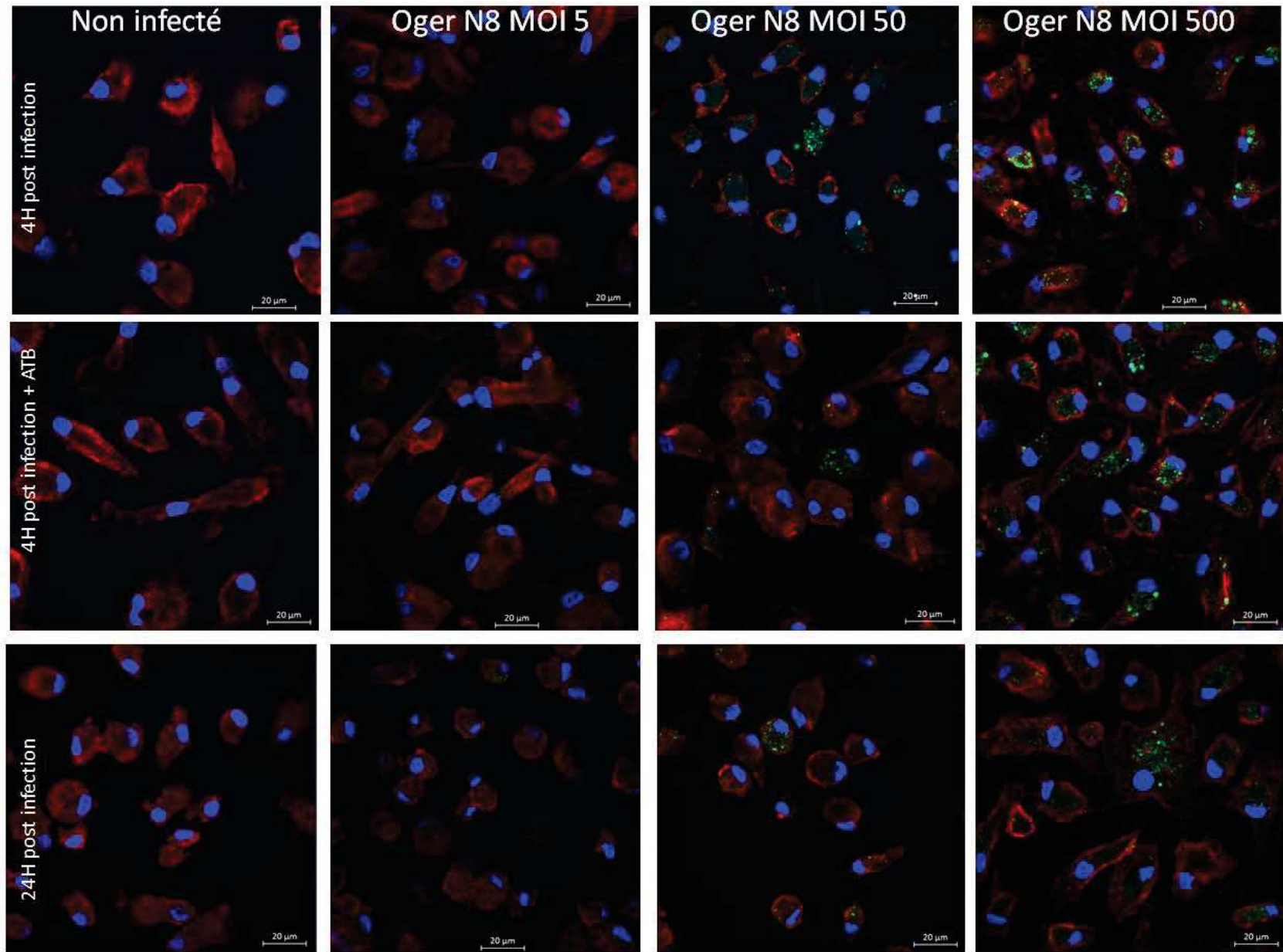


Figure 33 : Observation par microscopie confocale de macrophages bovins infectés ou non avec *M. bovis* Oger2 N8 à des MOI de 5, 50 et 500 en cinétique de 4h et 24h post infection. La condition à 4 heures post infection a été réalisée avec et sans antibiotique (tilmicosine). Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les membranes sont marquées en rouge (WGA-Alexa fluor 594), les mycoplasmes sont en vert (mNeonGreen). ATB=tilmicosine Les barres d'échelle sont à 20 μm. Grossissement X63

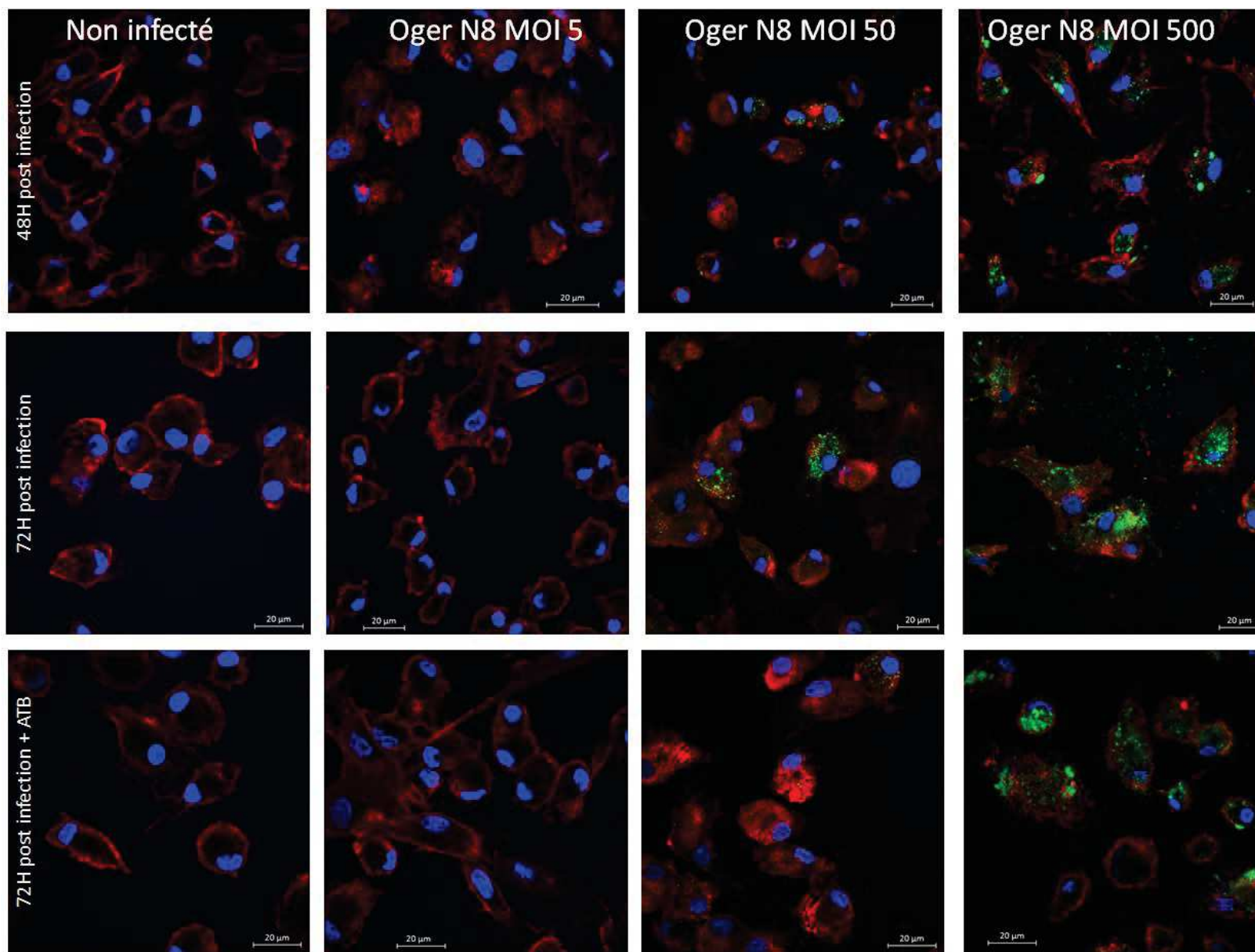


Figure 34 : Observation par microscopie confocale de macrophages bovins infectés ou non avec *M. bovis* Oger2 N8 à des MOI de 5, 50 et 500 en cinétique de 48h et 72h post infection. La condition à 72 heures post infection a été réalisée avec et sans antibiotique (tilmicosine). Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les membranes sont marquées en rouge (WGA-Alexa fluor 594), les mycoplasmes sont en vert (mNeonGreen). ATB=tilmicosine Les barres d'échelle sont à 20 μ m. Grossissement X63.

Pour pouvoir observer les mycoplasmes fixés au support pendant l'infection, d'autres images ont été réalisées avec une mise au point sur le fond de la lame, dans des puits avec et sans macrophages (**figure 35**). Cette figure montre qu'après 72 heures post infection en milieu acellulaire on voit moins de mycoplasmes qu'en présence de macrophages, où on observe un tapis de bactéries. En présence de tilmicosine on diminue dans les deux cas la quantité de mycoplasmes extracellulaires sans pour autant les éliminer, ce qui était attendu sachant que son effet n'est que partiel chez *M. bovis*. Ces images suggèrent fortement la présence d'un biofilm constitué de mycoplasmes, mais ceci devra être confirmé par une analyse 3D.

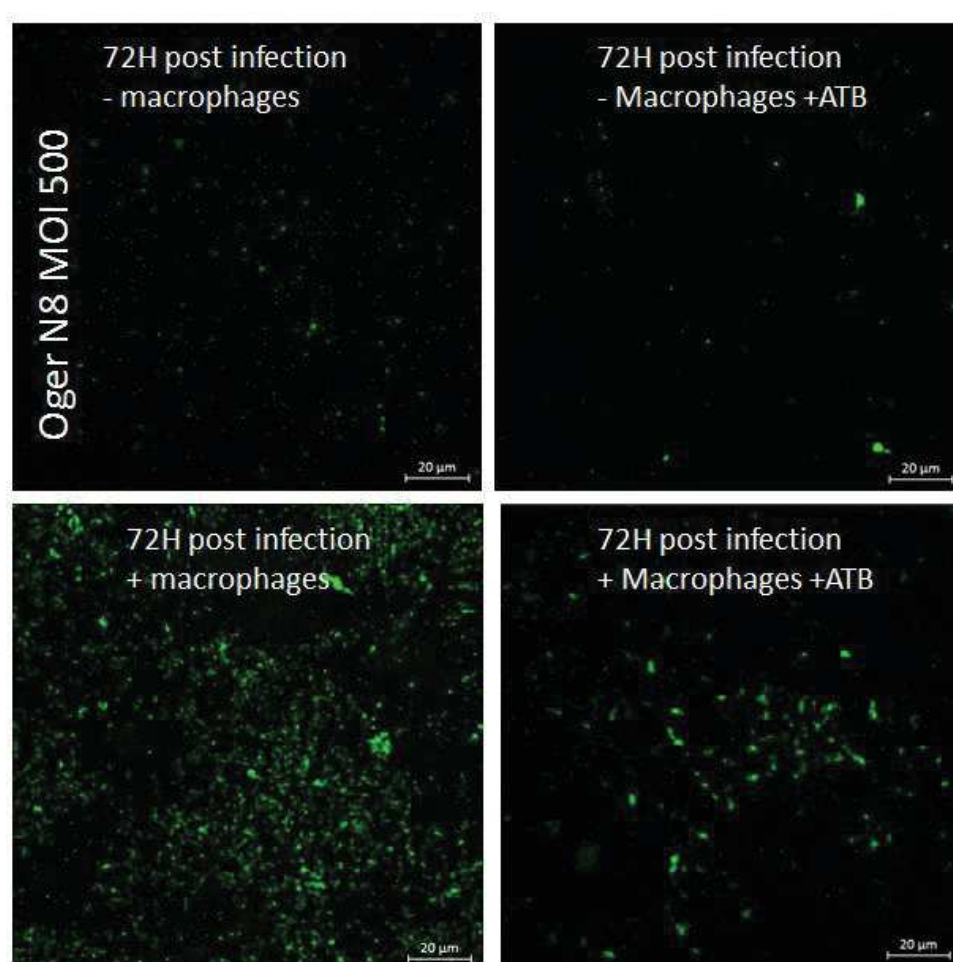


Figure 35 : Microscopie confocale montrant les mycoplasmes *M. bovis* Oger2 N8 sur le support de culture en présence ou absence de macrophages et antibiotique. ATB=tilmicosine.

Il a été montré que lorsque les bactéries s'organisent en biofilm elles deviennent résistantes aux antibiotiques, aux anticorps et à la phagocytose, contrairement aux cellules

dites planctoniques (McAuliffe et al., 2006). De plus, les biofilms peuvent être responsables de dommages tissulaires chez l'hôte liés à un afflux de cellules phagocytaires qui dégranulent sans pouvoir phagocyter les bactéries des biofilms et entraînent une inflammation chronique. Chez *M. bovis*, aucun changement concernant la sensibilité aux antibiotiques testés (enrofloxacin, danofloxacin, oxytétracycline) n'est observé (McAuliffe et al., 2006). Par contre, il a été montré une diminution de la sensibilité à la gentamicine chez des biofilms de *M. gallisepticum* (Chen et al., 2012). Les différences de sensibilité de *M. bovis* à la gentamicine observées précédemment (**Table 14**), montrant que, pour une même dose, la gentamicine est bactéricide en milieu PPLO et seulement partiellement inhibitrice en conditions de culture cellulaire, pourraient s'expliquer par cette capacité qu'à *M. bovis* à proliférer sur le support de culture.

Une autre méthode de titrage a été utilisée dans la littérature pour estimer la proportion de cellules infectées (van der Merwe et al., 2010). Cette méthode comporte plusieurs limitations et conforte le fait qu'il faut travailler en microscopie en parallèle des titrations. En effet dans cette étude, les auteurs ont montré, avec une technique de protection à la gentamicine suivie d'un titrage, que le pourcentage de PBMC infecté par *M. bovis* augmente avec le temps pour atteindre 100% de cellules infectées après 24 heures d'infection. Mais il faut prendre en compte que la viabilité cellulaire est impactée de façon proportionnelle au degré d'infection. De ce fait, la méthode de titrage sur gélose en estimant la proportion de cellules infectées paraît très aléatoire. De plus, cette méthode ne permet ni de déterminer précisément quelle population de PBMC contient du mycoplasme vivant ni si des différences de degré d'infectiosité existent entre les types cellulaires. En conséquence, si une cellule contenant plusieurs mycoplasmes se lyse pendant l'expérience elle libèrera des mycoplasmes capables de former des colonies et de fausser le titrage. Après 24 heures d'infection les cellules sont probablement plus fragiles et peuvent donc se lyser plus facilement au cours de la manipulation. Avec cette méthode incertaine de titrage les auteurs déduisent que tous les types cellulaires des PBMC sont infectés puisqu'il y a du mycoplasme dans 100% des cellules. Ces résultats sont appuyés par l'imagerie avec un marquage indirect des mycoplasmes qui révèle la présence de mycoplasmes dans tous les types cellulaires. Néanmoins les photos ne reflètent pas les résultats des titrages puisqu'on ne voit pas la différence du taux d'infection entre 2 ou 24 heures post infection. Il paraît

donc indispensable de travailler avec de l'imagerie ou de la cytométrie pour pouvoir confirmer les résultats de titrages. Dans nos expériences nous avons vu qu'à des MOI inférieures à 200 seulement quelques cellules étaient infectées et que ces cellules étaient infectées avec un ou plusieurs mycoplasmes. Si une cellule comme ceci se lyse elle peut facilement fausser le résultat du titrage et donc la conclusion de l'expérience dans les conditions expérimentales utilisées par van der Merwe et ses collaborateurs. C'est pour cela que, dans nos études, nous avons préféré lyser mécaniquement les cellules pour compter le nombre de mycoplasmes viables sans estimer la proportion de cellules infectées.

En ce qui concerne les expériences réalisées avec le clone fluorescent N6 de *Mmm* Rita, les résultats obtenus diffèrent de ceux de *M. bovis* (**figures 36 et 37**). En effet, à des MOI égales, on observe beaucoup moins de cellules infectées. Aux MOI de 5 et 50, on détecte de rares cellules infectées et contenant très peu de mycoplasmes. On peut voir des macrophages contenant des mycoplasmes en grand nombre seulement à la MOI de 500, alors qu'avec *M. bovis* on en voyait beaucoup déjà à la MOI de 50 (**Figure 33**). De plus, chez *Mmm* on n'observe pas d'augmentation du nombre des mycoplasmes à l'intérieur des cellules au cours du temps à la MOI de 500, ce qui suggère que l'infection est mieux contenue que chez *M. bovis*, peut-être dû à une moindre prolifération ou une dégradation simultanée de *Mmm*. En tout cas, dans les conditions dans lesquelles la prolifération est bloquée (en présence de tilmicosine) on observe beaucoup moins de mycoplasmes fluorescents déjà à partir de 4 heures post-infection. Cependant, comme chez *M. bovis*, des mycoplasmes fluorescents (même en très petit nombre) sont détectables à l'intérieur des cellules jusqu'à 72 heures post-infection, même sous l'effet bactériostatique de la tilmicosine et aux MOI les plus faibles. Ceci est très surprenant puisque cela sous-entend que même dans ces conditions les macrophages ne sont pas capables d'éliminer complètement les mycoplasmes.

Comme pour *M. bovis*, nous avons aussi analysé la fixation de *Mmm* au support après 72 heures d'infection en présence ou en absence de macrophages et avec ou sans tilmicosine (**figure 38**). Les résultats obtenus cette fois encore diffèrent fortement de ceux de *M. bovis*. En effet, que ce soit en présence ou en absence de macrophages à une MOI de 200 on n'observe que très peu de *Mmm* extracellulaires (**figure 38**). Il n'y a pas d'agrégats visibles comme c'était le cas pour *M. bovis*. De plus, en présence de tilmicosine, on ne

distingue plus de mycoplasmes extracellulaires. Cette quantité de mycoplasmes fixés au support nettement plus faible pour *Mmm* que pour *M. bovis* est également observée avec ou sans macrophages (bien qu'à des MOI plus faibles) lorsqu'on titre les mycoplasmes adhérents après 72h (**figure 30 et 31**).

Par ailleurs, nous avons vérifié que les puits contenant des macrophages infectés ne contenaient pas moins de cellules que les puits contrôles non infectés. En effet, l'infection joue sur la viabilité des cellules mais le temps de culture aussi. Nous n'avons pas vu de différence significative entre les puits contrôles et les puits infectés en ce qui concerne le nombre de cellules. Au cours du temps, il y a moins de cellules dans les conditions contrôles comme dans les infections. Néanmoins, il reste un nombre de cellules important qui permet de réaliser des photos représentatives de l'infection. Un exemple est illustré en **figure 39** où l'on voit à 72 heures un grand nombre de cellules par champ dans le cas d'une infection avec *Mmm* à une MOI de 200. La différence observée entre les cellules contrôles non infectées et les cellules infectées est la taille des cellules, qui sont beaucoup plus étalées, et ce, de façon proportionnelle à leur degré d'infection.

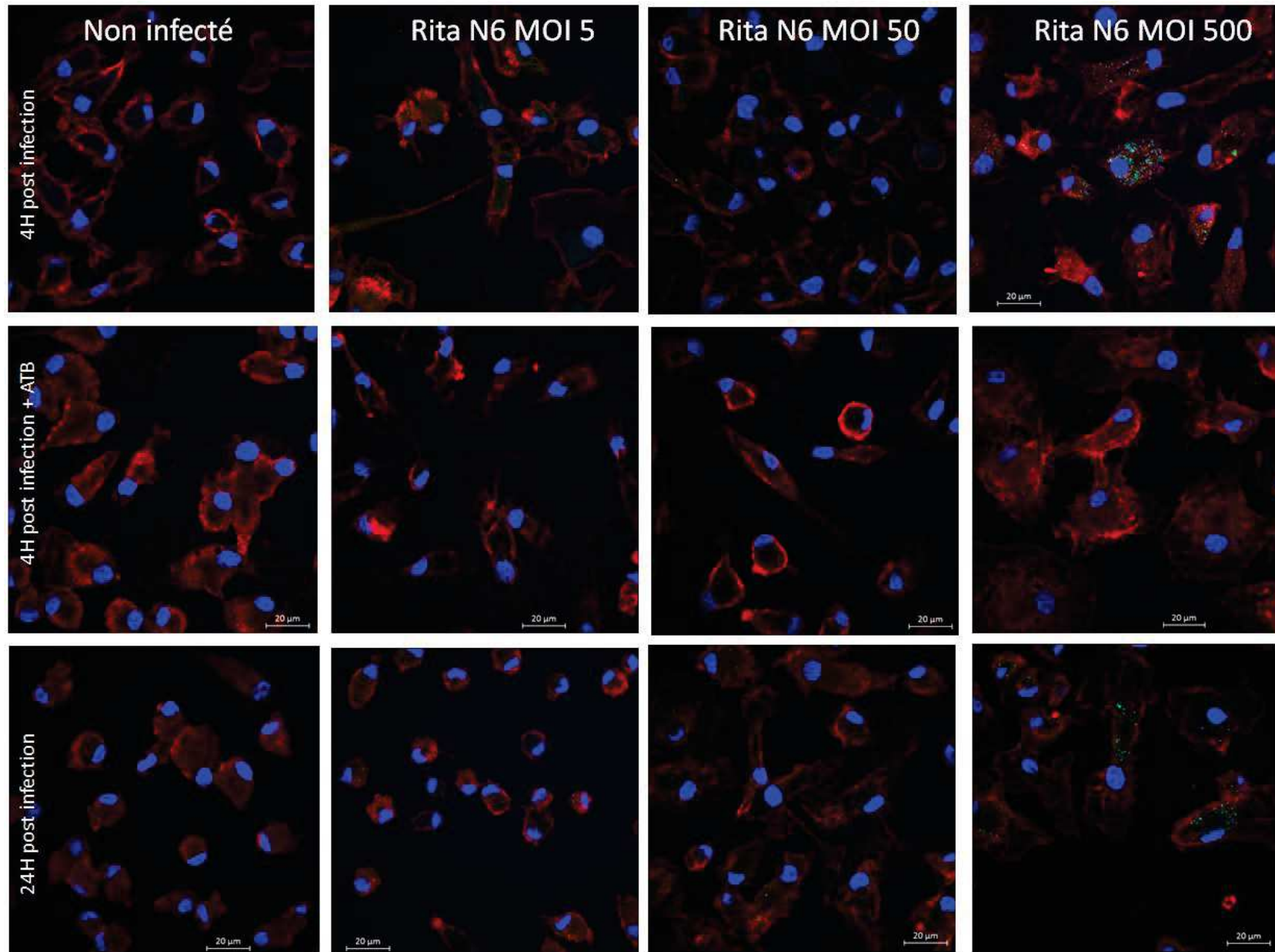


Figure 36 : Observation par microscopie confocale de macrophages bovins infectés ou non avec *Mmm* Rita N6 à différentes MOI en cinétique de 4h et 24h post infection. La condition à 4 heures post infection a été réalisée avec et sans antibiotique (tilmicosine). Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les membranes sont marquées en rouge (WGA-Alexa fluor 594), les mycoplasmes sont en vert (mNeonGreen). ATB=tilmicosine. Les barres d'échelle sont à 20 μm. Grossissement X63.

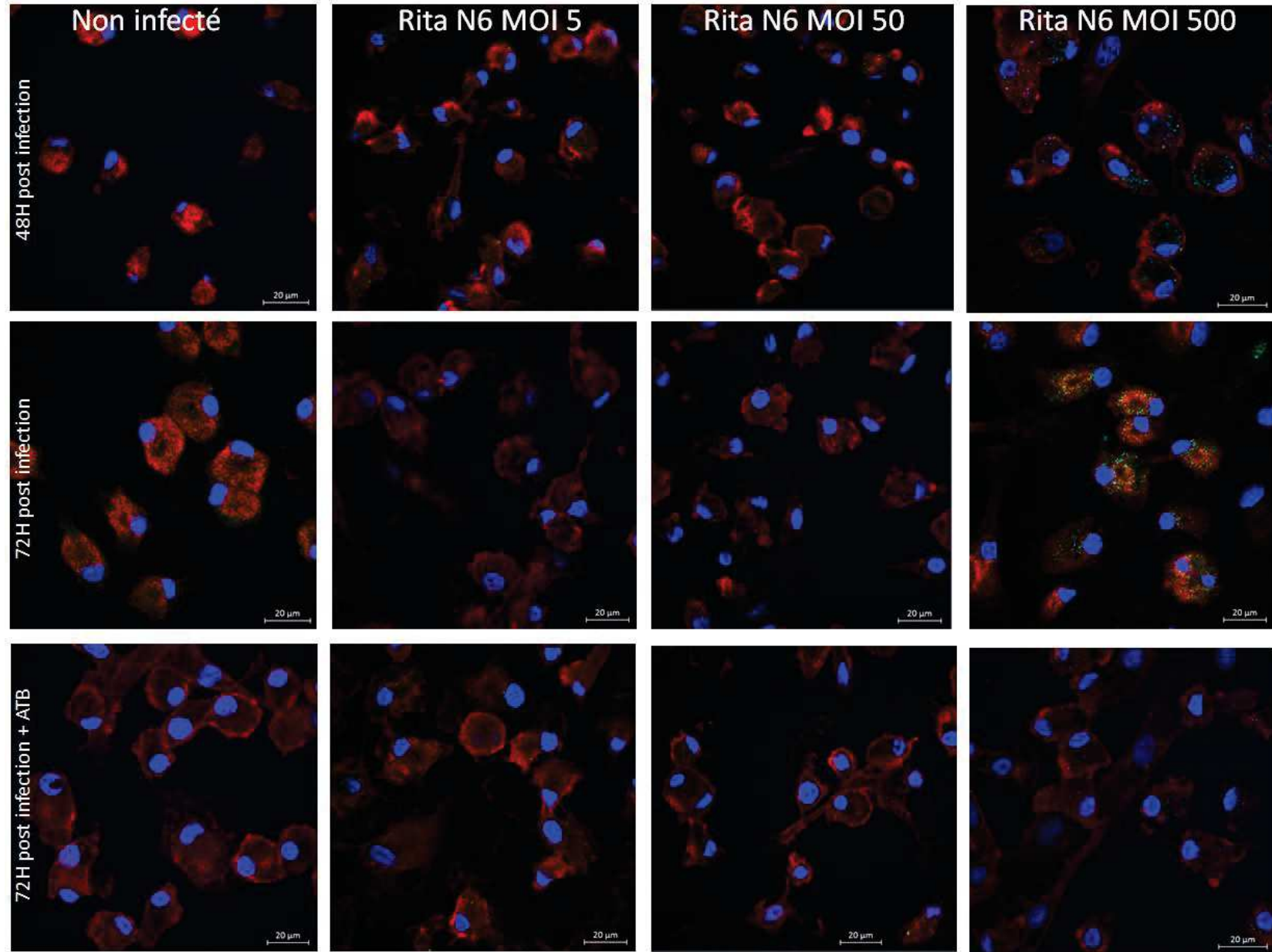


Figure 37 : Observation par microscopie confocale de macrophages infectés ou non avec *Mmm* souche Rita N6 à différentes MOI en cinétique de 48h à 72h post infection. La condition à 72 heures post infection a été réalisée avec et sans antibiotique (tilmicosine). Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les membranes sont marquées en rouge (WGA-Alexa fluor 594), les mycoplasmes sont en vert (mNeonGreen). ATB=tilmicosine Les barres d'échelle sont à 20 μ m. Grossissement X63.

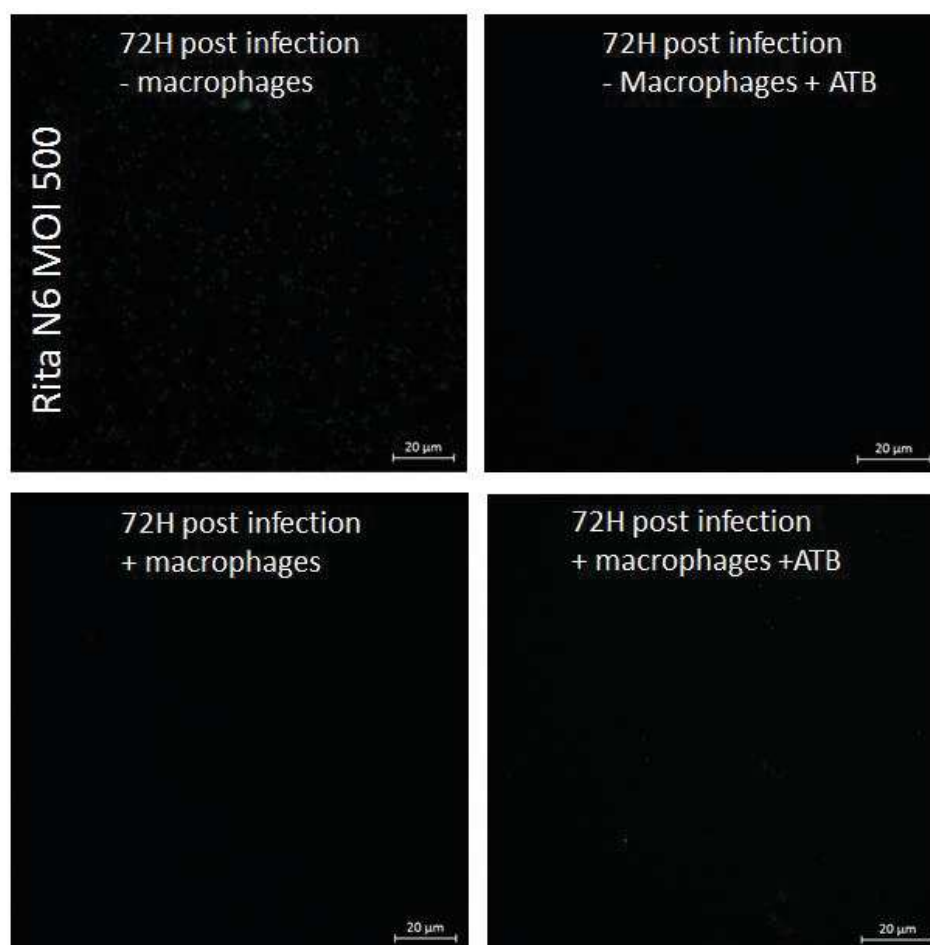


Figure 38 : Microscopie confocale montrant les mycoplasmes Mmm Rita N6 sur le support de culture en absence ou en présence d'antibiotique et en présence ou absence de macrophages. ATB=tilmicosine.

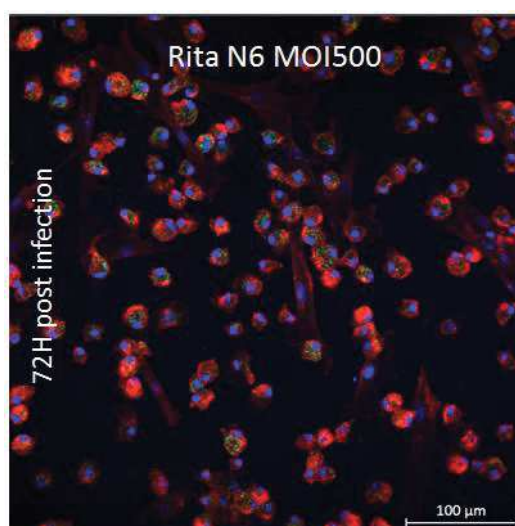


Figure 39 : Macrophages infectés avec Mmm souche Rita N6 à une MOI de 200 après 72 heures d'infection au grossissement 40. Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les membranes sont marquées en rouge (WGA-Alexa fluor 594), les mycoplasmes sont en vert (mNeonGreen) Les barres d'échelle sont à 100 µm.

II.2 Utilisation des mycoplasmes fluorescents pour déterminer l'adhérence aux cellules stromales (non phagocytaires)

Dans un second temps nous voulions utiliser l'outil mycoplasme fluorescent pour déterminer de manière directe les capacités d'adhérence et d'invasion des mycoplasmes aux différents types cellulaires à étudier en utilisant notamment la cytométrie en flux et la microscopie confocale.

Nous avons réalisé des infections des cellules EBL pour cet essai préliminaire car il s'agit d'une lignée cellulaire adhérente plutôt facile d'entretien. Les cultures ont été effectuées en plaque sur lamelle de verre puisque les mycoplasmes n'adhèrent que très peu au support de culture inerte (**figure supplémentaire annexe 8**). Nous avons infecté les cellules EBL avec les clones fluorescents N6 et N8 de *Mmm* Rita et *M. bovis* Oger2.

Après une infection à une MOI de 200 pendant deux heures à 37°C, nous avons analysé les cellules à 4 et 24 heures post infection. Nous avons continué la cinétique jusqu'à 48 heures post infection mais les cellules EBL ont continué leur croissance rapide (même en présence d'une forte MOI de mycoplasmes) et se sont décollées du fond du puit, rendant l'analyse impossible.

Pour les analyses par cytométrie en flux, les cellules ont été préalablement décollées à la trypsine ou à l'EDTA. Nous n'avons pas détecté de fluorescence pour aucune des deux souches et à aucun de deux temps d'analyse. Pour les analyses par microscopie confocale nous avons procédé aux lavages et marquages des noyaux et membranes cellulaires à 4 et 24 heures post infection comme indiqué précédemment. Sur les images de la **figure 40** nous pouvons voir la différence flagrante d'adhérence, invasion et prolifération entre la souche fluorescente de *Mmm* et celle de *M. bovis* et ce, que ce soit à 4 ou 24 heures post infection. En effet, *M. bovis* adhère tout autour de la cellule et apparaît même intracellulaire à des endroits, alors que *Mmm* n'adhère que sporadiquement aux cellules. Des foyers de *M. bovis*, adhérents en grand nombre sont déjà observés 4 heures post infection et ils sont amplifiés 24 heures après. Cependant, la présence de *M. bovis* en grand nombre n'a pas modifié la vitesse de croissance des cellules.

Il est surprenant que par cytométrie en flux nous ne voyions pas de signal de fluorescence dans le cas d'infection avec *M. bovis*, alors que les résultats obtenus en microscopie sont sans appel. Il est fortement probable que les interactions entre les mycoplasmes et les cellules EBL aient été supprimées avec le traitement pour le décollage des cellules. Ceci limite l'application de la cytométrie en flux pour l'étude des interactions entre les mycoplasmes et les cellules fortement adhérentes.

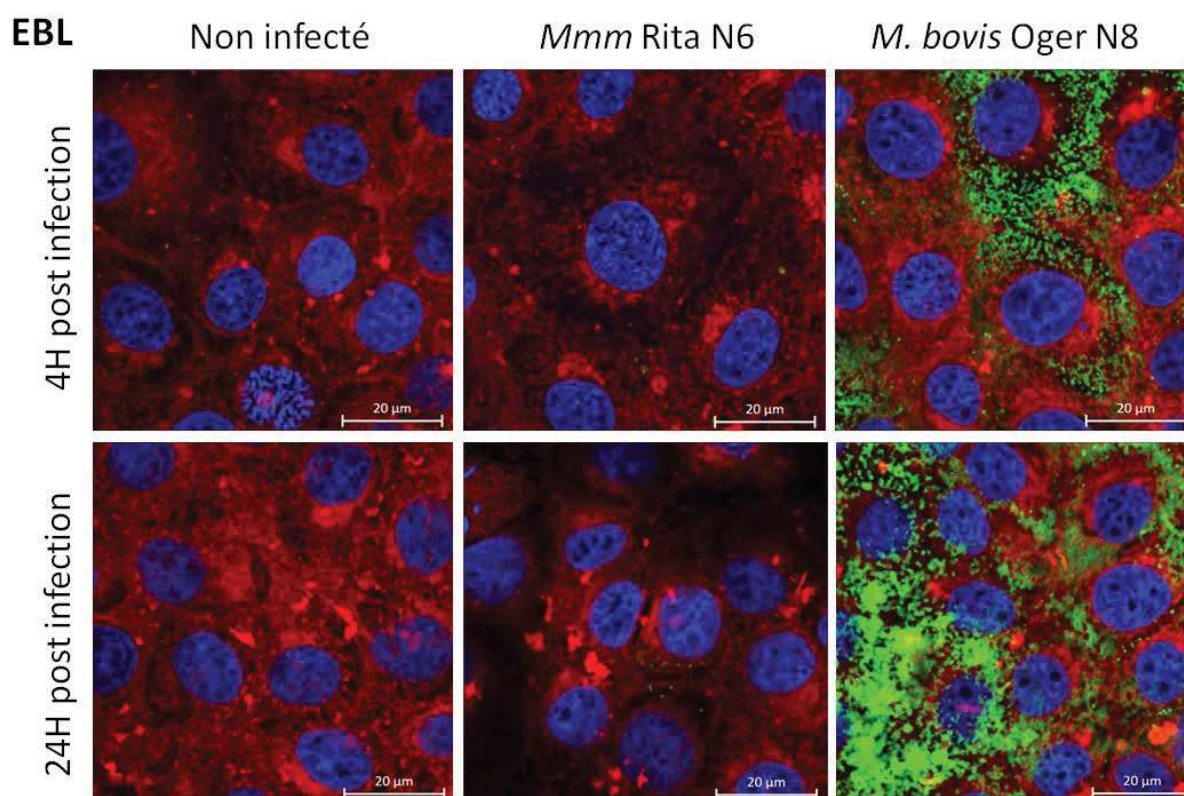


Figure 40 : Microscopie confocale des cellules EBL infectées durant 2 heures avec des mycoplasmes fluorescents à une MOI de 200. Sont représentés de gauche à droite des cellules EBL non infectées puis infectés avec *Mmm* souche Rita N6 exprimant mNeonGreen puis avec *M. bovis* souche Oger2 N8 exprimant aussi mNeonGreen. Les images du hauts sont réalisées au bout de 4 heures post infection et celle du bas après 24 heures. Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les membranes sont marquées en rouge (CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain), les mycoplasmes sont marqués en vert (mNeonGreen) Les barres d'échelle sont à 20 µm. Grossissement X63.

Dans la littérature on trouve des données contradictoires en ce qui concerne l'adhérence de *Mmm* aux cellules épithéliales embryonnaires bovines de poumons. Dans une première étude les auteurs ont montré une très faible adhérence aux cellules primaires épithéliales embryonnaires bovines (Aye et al., 2015). Ces résultats sont en accord avec les résultats que nous avons obtenus et avec la pathogénie puisqu'une infection à *Mmm* n'entraîne pas de symptômes chez les veaux infectés. D'autres auteurs ont, eux, mis en

évidence l'attachement de la souche Ben-1 aux EBL et ont proposé une protéine qui contribuerait à cette adhérence spécifique. Néanmoins, ces auteurs ne mettent pas en évidence le mycoplasme mais révèlent juste la présence d'antigène du mycoplasme par détection au microscope confocal après des marquages anticorps indirects (Zhou et al., 2016).

III Conclusions et perspectives :

Nous avons développé un outil performant capable de permettre la visualisation *in vitro* des interactions entre les mycoplasmes et les cellules de l'hôte.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les macrophages bovins et les mycoplasmes *Mmm* (souche Rita) et *M. bovis* (souche Oger2). Les résultats des travaux décrits dans ce chapitre permettent de mettre en évidence des comportements très différents entre les deux souches étudiées en ce qui concerne leur capacité de survie en présence de macrophages bovins. Ces résultats peuvent être représentatifs d'autre souches virulentes de *Mmm*, car il y a que très peu de polymorphisme intraspécifique alors que les résultats obtenus chez *M. bovis* sont certainement plus dépendants de la souche étudiée si l'on prend en considération la grande disparité observée dans d'autres études selon les isolats étudiés (Suleman et al., 2016).

Une première approche, basée sur la mesure du titre post infection avec ou sans lavages indique, aux MOI les plus faibles de 2-5, une plus grande capacité de survie de *M. bovis* comparée à *Mmm* après 3 jours d'incubation. Ceci est aussi accompagné d'une capacité d'adhérence au support (plastique/cellules) beaucoup plus importante que chez *Mmm*. Par contre, la prolifération significative (jusqu'à 1 log) des bactéries en suspension observée à 4h en présence de macrophages est comparable pour les deux mycoplasmes. La persistance des mycoplasmes en présence de macrophages peut alors s'expliquer en partie par une balance entre prolifération et élimination, mais dénote aussi une certaine résistance à la phagocytose. Ceci peut s'expliquer par l'absence d'opsonisation dans nos conditions expérimentales. En effet, sans opsonines, la phagocytose, et donc l'élimination par les macrophages de certains mycoplasmes dont *M. bovis*, est fortement compromise (Howard, 1984; Marshall et al., 1995). Cependant, nos résultats de microscopie confocale indiquent

qu'il y a bien eu internalisation des mycoplasmes par les macrophages après 4 heures, et que celle-ci augmente avec la MOI et paraît plus efficace pour *M. bovis* que pour *Mmm*.

La microscopie confocale a permis de confirmer visuellement la plus forte capacité de *M. bovis* à se fixer au support de culture par rapport à *Mmm*. Ce résultat peut s'expliquer par les capacités différentes de *M. bovis* et *Mmm* à former des biofilms, comme décrit précédemment (McAuliffe et al., 2006). Cependant, nos résultats montrent également que les macrophages ont un fort effet potentialisateur sur la capacité qu'a *M. bovis* à proliférer sur le support de culture. L'association entre biofilms et épithélium a été observée *in vivo* chez la souris pour *M. pulmonis* (Simmons and Dybvig, 2009) mais il n'y a, à notre connaissance, pas d'étude décrivant un effet amplificateur *in vitro* par des cellules eucaryotes sur la formation de biofilms par les mycoplasmes. Il serait intéressant de vérifier si cet effet potentialisateur est maintenu en présence d'opsonines (anticorps spécifiques ou sérum non décomplémenté). En effet, la reconnaissance du microorganisme sera alors indirecte et la phagocytose sera dépendante de récepteurs différents tel que les récepteurs au fragment Fc des anticorps et les récepteurs au complément.

De plus, la microscopie confocale a permis de confirmer la présence de mycoplasmes fluorescents, et donc vivants, à l'intérieur des macrophages après 72 heures post-infection, et ceci même aux MOI les plus faibles et en présence de doses bactériostatiques d'antibiotique (pour *Mmm*). Ceci suggère, soit une résistance à la phagocytose, soit une survie des mycoplasmes dans les macrophages, ou une combinaison des deux, dans les conditions d'infection sans opsonisation.

Nous n'avons pas pu réaliser le test de protection à la gentamicine qui s'est avéré inefficace dans les conditions de culture utilisées dans nos tests cellulaires. En effet, la capacité de *M. bovis* à adhérer au support de culture, voire à former des structures de type biofilm, pourrait expliquer la perte de sensibilité à la gentamicine par rapport au milieu PPLO (Mah and O'Toole, 2001). D'autres antibiotiques devront être testés dans les mêmes conditions avant de pouvoir poursuivre ce travail. Encore une fois, nous n'avons pas trouvé un antibiotique efficace pour empêcher la prolifération *M. bovis* dans nos conditions de culture.

Dans le cadre des interactions avec les macrophages, l'outil « mycoplasme fluorescent » pourrait être utilisé pour comparer la résistance à la phagocytose en cytométrie en flux, en fluorimétrie ou en microscopie automatisée. En effet, ces techniques de détection rapides et quantitatives, pourraient après le début de l'infection, mettre en évidence les différences en matière de résistance à la phagocytose. Particulièrement, la cytométrie pourrait être très adaptée pour analyser la résistance à la phagocytose de certaines souches. En effet, cette technique resterait exploitable au début de l'infection, quand des quantités importantes de mycoplasmes sont présentes à l'intérieur des macrophages. On pourrait comparer ainsi le comportement des souches virulentes et avirulentes, ou certains variants (avec et sans capsule par exemple) vis-à-vis de la phagocytose. Pour cela il faudrait travailler dans des conditions plus physiologique avec l'ajout de sérum complet contenant du complément et d'autres facteurs qui ont un rôle important dans la phagocytose indirecte (Marshall et al., 1995).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les cellules embryonnaires bovines de poumons (EBL) et les mycoplasmes *Mmm* Rita N6 et *M. bovis* Oger2 N8 d'un point de vue de l'adhérence et l'invasion cellulaire. Nous avons pu observer une différence très contrastée entre *M. bovis*, qui adhère fortement aux cellules, prolifère et les envahit, et *Mmm*, qui n'adhère que sporadiquement aux cellules. Nous avons pu montrer ainsi, que ce type d'analyse permet de mettre en évidence des différences d'adhésion et invasion entre espèces, souches ou mutants fluorescents à différentes cellules.

Puisque notre outil de marquage est basé sur un plasposon qui permet l'insertion stable et au hasard de la cassette d'expression dans le génome des mycoplasmes, il est parfaitement adapté pour produire des banques de mutants fluorescents. Il serait donc intéressant de développer une méthode de criblage permettant l'identification des mutations responsables de la perte d'adhérence, invasion et prolifération, et donc l'identification de nouveaux facteurs de virulence. Pour cela, il faudrait une méthode d'analyse quantitative suffisamment sensible donc nous devons exclure la cytométrie en flux. Nous envisageons l'utilisation de la fluorimétrie pour l'analyse à haut débit de ces interactions, directement sur la monocouche non altérée, au fond des puits de plaque 96 combinée bien sûr avec des illustrations par microscopie confocale.

Chapitre 4

Expression hétérologue d'antigènes viraux chez les mycoplasmes

I Introduction

Il a déjà été démontré que les mycoplasmes, et notamment ceux appartenant au groupe mycoides, sont capables d'exprimer diverses protéines hétérologues (Duret et al., 2003; Dybvig et al., 2000; Janis et al., 2005). Nous avons-nous-même au cours de cette thèse réussi à faire exprimer des protéines fluorescentes à deux espèces différentes de mycoplasmes : *Mmm* et *M. bovis* (Bonnefois et al., 2016). Le dernier objectif de cette thèse était de démontrer la faisabilité et la pertinence de l'utilisation des mycoplasmes comme vecteurs vaccinaux. Cet objectif dépendait de l'expression de gènes hétérologues.

Parmi les ruminants, les mycoplasmes et les *Morbillivirus* sont des pathogènes importants qui sont souvent associés et pour qui l'obtention d'un vaccin multivalent serait une grande avancée. Chez les bovins, des campagnes vaccinales contre la peste bovine et la PPCB ont permis l'éradication en 2011 de la peste bovine et le contrôle de la PPCB (Brown and Taylor, 1966). Chez les petits ruminants, la PPR et la PPCC sont considérées parmi les maladies infectieuses prioritaires en Afrique et en Asie, bien que la PPCC soit souvent sous diagnostiquée sur le terrain. De plus, les caprins peuvent être infectés par plusieurs mycoplasmes pathogènes tels que *Mmc*, qui présente une répartition mondiale.

Il y a quelques années, dans notre laboratoire, on avait tenté l'expression de la glycoprotéine H du virus de la PPR chez *Mmc* pour évaluer la pertinence de l'utilisation des mycoplasmes comme vecteurs vaccinaux dans le but d'obtenir un vaccin bivalent efficace (Salah, 2008). A l'époque, l'intégralité du gène de la protéine virale avait été clonée dans un plasmide oriC sous le contrôle d'un promoteur fort de *Mmc*. Les séquences n'avaient pas été optimisées selon l'usage préférentiel de codons des mycoplasmes et le site de clonage générerait un décalage entre les séquences du promoteur / RBS et le début du gène. Aucune

expression de la H-PPR n'avait pas pu être démontrée à partir de cette construction chez *Mmc*.

Les résultats encourageants obtenus avec l'expression de gènes fluorescents par les mycoplasmes nous ont permis d'envisager l'utilisation de notre système d'expression pMT/exp pour exprimer de gènes plus complexes tels que des gènes viraux. Nous avons donc décidé de retenter l'expression de la protéine H du virus de la PPR chez *Mmc* pour réaliser la preuve de concept de l'utilisation des mycoplasmes comme vecteur vaccinal.

I.1. La peste des petits ruminants

La PPR est une maladie virale, contagieuse, très grave sur le plan clinique, listée parmi les maladies à déclaration obligatoire à l'OIE. Les conséquences de la maladie sont directes, avec des pertes importantes pouvant engager le maintien de l'activité d'élevage, ou indirectes par l'application locale de mesures de contrôle ou de barrières sanitaires à l'échange d'animaux (Banyard et al., 2010). Les impacts socio-économiques sont dramatiques pour les éleveurs de chèvres et moutons, où les taux de morbidité et mortalité peuvent atteindre respectivement 80% et 90-100%. La PPR, sévissant jusque-là en Afrique, au Moyen Orient et en Asie, est en expansion et constitue une menace pour l'Europe car elle se trouve maintenant à ses frontières : à l'est avec la Turquie depuis 2004, et plus au sud, avec le Maroc depuis l'été 2008 (Charbonnier et al., 2015).

La PPR est due à un virus du genre *Morbillivirus* de la famille des *Paramyxoviridae*. Il s'agit d'un virus enveloppé, pléomorphe dont la taille varie de 400-500 nm (Gibbs et al., 1979). Son génome, d'une taille d'environ 16 kb (Bailey et al., 2005), est constitué d'un ARN monocaténaire négatif non segmenté codant pour six protéines structurales (N, P, M, F, H et L) et deux protéines non structurales (C et V) (Bailey et al., 2007, **figure 41**). La nucléoprotéine (N) forme un manchon protecteur autour de l'ARN génomique. Elle est la protéine la plus abondante dans le virus et donc la cible préférentielle des anticorps. Les antigènes de la N sont largement utilisés dans les tests de diagnostic. En revanche, les anticorps produits ne sont pas neutralisants *in vitro* (Diallo et al., 2007; Sinnathamby et al., 2001). La phosphoprotéine (P) interagit avec la protéine N et favorise l'encapsidation des ARN viraux néo-synthétisés. Elle interagit aussi avec l'ARN polymérase ARN dépendante (L)

pour former le complexe de polymérisation de l'ARN, responsable de la synthèse des ARNm et de la réplication de l'ARN viral génomique. La polymérase L possède en effet toutes les activités enzymatiques nécessaires à la polymérisation de l'ARN, initiation, élongation, terminaison, coiffage, méthylation et polyadénylation (Schnell and Conzelmann, 1995). Lors de sa libération, le virus emprunte son enveloppe à celle de la cellule hôte, dans laquelle s'insèrent la protéine de matrice (M), la plus petite des protéines virales (335 aa), qui recouvre la face intérieure de l'enveloppe virale et sert de lien avec la nucléocapside (Haffar et al., 1999), et les deux glycoprotéines de surface F et H. L'hémagglutinine (H), longue de 609 aa, est une protéine glycosylée qui permet la fixation du virus au récepteur de la cellule hôte. La protéine de fusion (F), aussi glycosylée, est composée de 546 aa. Elle est responsable de la fusion entre les membranes du virus et de la cellule hôte. Cette activité n'est acquise qu'à la suite d'un processus de maturation qui aboutit au clivage de F en deux sous-unités : F1 et F2. Ce clivage, effectué par une protéase cellulaire, permet de libérer à l'extrémité de F1 un peptide très hydrophobe dit peptide de fusion (Meyer and Diallo, 1995). Les deux protéines glycosylées F et H sont la cible d'anticorps neutralisants *in vitro* et sont utilisés dans les tests de diagnostic, ainsi que pour le développement de vaccins recombinants (Parida et al., 2015). Finalement, les deux protéines non structurales (C et V) ne sont retrouvées que dans les cellules infectées. Ces protéines interfèrent également avec l'immunité innée en bloquant la réponse interféron (Chinnakannan et al., 2013; Sanz Bernardo et al., 2017).

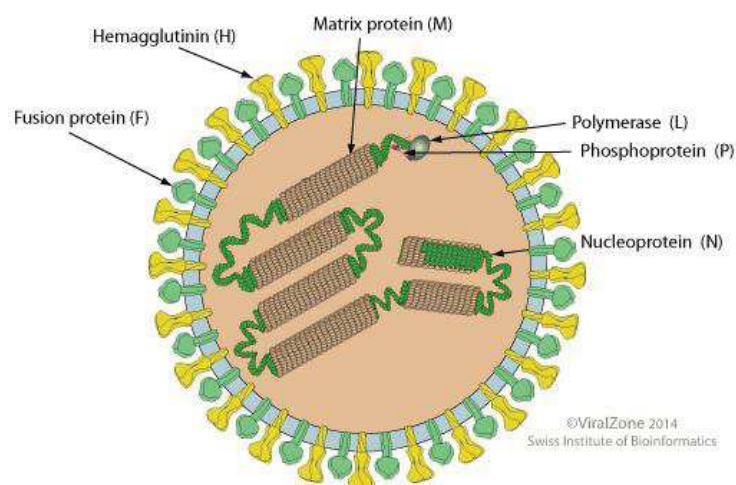


Figure 41 : Structure schématique du virion de la peste des petits ruminants (PPR)

Il existe un vaccin homologue largement utilisé pour lutter contre la peste des petits ruminants. Développé en 1989 par atténuation de la souche virulente Nigéria 75/1 par passages successifs sur des cellules (Diallo et al., 1989), ce vaccin offre une bonne protection aux animaux durant leur vie économique, soit environ trois ans. De plus, ce vaccin peut s'utiliser aussi chez les femelles gestantes. En 25 ans, ce vaccin a prouvé son efficacité indépendamment des lignées virales et son coût de production est faible à large échelle (Sen et al., 2010). Néanmoins, ce vaccin est sensible à la chaleur, or dans les pays du Sud il n'est pas toujours facile de conserver la chaîne du froid pendant les campagnes de vaccination. Des essais de stabilisation thermique lui associant un cryo-protecteur ont permis de prolonger la demi-vie de quelques heures à 21 heures à 37°C après reconstitution et jusqu'à 14 jours à 45°C sous sa forme lyophilisée (Charbonnier et al., 2015). Un autre facteur limitant dans les programmes de lutte contre la PPR est que ce vaccin ne permet pas la distinction sérologique entre animaux vaccinés et animaux naturellement infectés (concept DIVA). Le développement d'un vaccin PPR marqué rendrait possible cette distinction et permettrait d'améliorer l'efficacité des mesures de contrôle tout en allégeant les contraintes sur les échanges d'animaux. Ainsi, des animaux vaccinés et non infectés provenant d'une zone où l'infection a été contrôlée, pourraient être exportés (Charbonnier et al., 2015). De plus, l'utilisation de vaccins multivalents permettrait de limiter les coûts de vaccination, qui reposent principalement sur l'organisation des campagnes, en limitant le nombre d'interventions nécessaires pour protéger les animaux contre plusieurs maladies. Ceci devient particulièrement intéressant lorsque l'on prend en considération le programme d'éradication mondiale de la PPR d'ici 2030 (Charbonnier et al., 2015).

Des vaccins multivalents recombinants ont été obtenus en utilisant des virus capripox atténués comme vecteurs exprimant les gènes F (Berhe et al., 2003) ou H (Diallo et al., 2002) du virus de la PPR. Cette approche permet la production de vaccins multivalents grâce au fait que les pox virus (responsables de la variole) sont capables d'exprimer plusieurs gènes hétérologues. Ces vaccins offrent ainsi une double protection contre la variole et la PPR, qui sont deux maladies importantes chez les moutons et chez les chèvres endémiques dans les mêmes zones géographiques. Cependant, si bien elles ont montré une certaine efficacité pour protéger les chèvres et les moutons (Chen et al., 2010), ces résultats ont été récemment nuancés (Caufour et al., 2014). En effet, en présence d'une immunité ancienne

naturelle contre le virus de la PPR, les vaccins recombinants n'ont pas une efficacité complète. Ceci s'explique par le fait que les anticorps anti-PPR présents avant la vaccination ralentissent la réplication des capripox-PPRV H et F vaccinaux, ce qui réduit l'expression des protéines H et F et donc la réponse anticorps spécifique contre le virus recombinant. Le même type d'approche a aussi été réalisé chez les adénovirus (Herbert et al., 2014). D'autres avantages importants de ces vaccins sont qu'ils permettent la différenciation entre les animaux naturellement infectés et les animaux vaccinés (DIVA) et qu'ils sont thermorésistants. Mais cette approche vaccinale ne peut pas être utilisée actuellement pour le développement de vaccins anti-mycoplasmoses puisque l'on ne connaît toujours pas les antigènes permettant la protection contre ces maladies. Jusqu'à présent, il est difficile d'imaginer qu'un seul antigène mycoplasmaïque présenté par un vecteur viral permette d'obtenir une protection efficace. Les vaccins actuels qui protègent des mycoplasmoses contiennent la bactérie dans son ensemble, que ce soit atténuée (exemple de la PPCB) ou tuée et adjuvée (cas de la PPCC) et ces vaccins confèrent une protection plus ou moins satisfaisante.

L'objectif de ce chapitre de thèse était alors de retenter l'expression de la H-PPR par *Mmc* en utilisant notre système d'expression de gènes pMT/exp pour fournir une preuve de concept de l'utilisation des mycoplasmes comme vecteur vaccinaux. L'obtention de mycoplasmes recombinants exprimant la H de la PPR permettrait d'avoir un vaccin DIVA et thermorésistant car nous formulerions ce vaccin, au moins en première intention, à partir d'une souche pathogène tuée et adjuvée à la saponine, comme l'est actuellement le vaccin contre la PPCC. Si l'expression virale était suffisante chez les mycoplasmes nous vérifierons la production d'anticorps neutralisants *in vivo* après immunisation de lapins.

II Résultats

II.1. choix des modèles d'étude pour la preuve de concept d'un vaccin recombinant mycoplasme - PPRV

- Choix du mycoplasme modèle

Le modèle le plus adapté pour produire un vaccin bivalent avec le virus de la PPR serait *Mccp*, l'agent de la PPCC, car cette maladie présente pratiquement la même répartition géographique que la PPR (Manso-Silván et al., 2011). Cependant, sa culture est longue et fastidieuse en laboratoire donc nous avons préféré réaliser la preuve de concept de vaccin bivalent avec *Mmc*, qui est lui aussi un mycoplasme pathogène des petits ruminants mais a l'avantage d'une culture très aisée.

- Choix de la protéine virale et analyse structurale des domaines protéiques

Pour développer notre preuve de concept de vaccin bivalent *Mmc* - PPR nous voulions des protéines virales capables d'induire une réponse immunitaire suffisante avec la présence d'anticorps neutralisants. Seules les protéines H et F du virus de la PPR sont capables d'induire cette production. Nous avons choisi la H car la F subit un processus de maturation bien particulier dans la cellule qu'il sera impossible d'obtenir dans le mycoplasme. Les anticorps que l'on cherche à faire produire par l'hôte doivent être en mesure de reconnaître les épitopes présents lors d'une véritable infection à la suite de la vaccination.

La protéine H du virus de la PPR est composée de 609 acides aminés et utilise le codon UGA (W) en tant que codon stop. Le pourcentage en GC de cette protéine avoisine les 47%. Cette protéine est donc largement plus riche en CG que les protéines mycoplasmiques. En ce qui concerne la structure, cette protéine contient un domaine hydrophobe de 24 acides aminés localisé en position 35-58 près de l'extrémité N-terminale (**figure 42**). Ce domaine forme une hélice transmembranaire et joue le rôle d'un peptide signal, permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane cellulaire cible. Les 34 acides aminés qui précèdent le peptide signal à l'extrémité N-terminale restent cytoplasmiques alors que l'extrémité C-terminale est transloquée à l'extérieur de la cellule. Cette configuration de la

protéine H, avec un domaine d'ancrage à la membrane en N-terminal et le domaine extérieur en C-terminal, est spécifique des glycoprotéines de type II (Plempner et al., 2000).

Le peptide signal de la H-PPR présente une certaine similitude avec le peptide signal des pro-lipoprotéines des mycoplasmes (**Annexe 9**). Ce peptide signal est caractérisé par un motif « MKK » en N-terminal et un motif « VVS-C » en position 21 à 24. Ce dernier, correspondant au site de reconnaissance du signal de la peptidase de type II, indique qu'une modification lipidique aura lieu au niveau de la cystéine (C, lieu d'ancrage à la membrane) et que les 23 acides aminés précédant ce résidu seront tronqués, comme décrit chez *Mmm* (Persson et al., 2002). Nous avons donc décidé de tester deux constructions différentes pour l'expression de la H-PPR chez les mycoplasmes : une contenant la H-PPR dans son intégralité et une autre où la partie codant pour le peptide signal viral serait remplacée par un peptide signal mycoplasmaïque, tel qu'indiqué en **Figure 42**.

- Synthèse de la protéine virale

La protéine virale native étant riche en GC et utilisant les codons stop différents de ceux des mycoplasmes, nous avons choisi d'optimiser la séquence protéique suivant l'usage préférentiel des codons des mycoplasmes comme pour les protéines fluorescentes (cf chapitre 2). Après optimisation automatique, nous avons fait synthétiser la séquence de la protéine H de la souche vaccinale Nigéria 75/1 par la société Proteogenix en y incluant les sites de restriction *NcoI* en 5' et *AflIII* en 3' pour la réalisation d'un clonage orienté dans le plasposon pMT/exp. Nous avons aussi fait synthétiser cette séquence en remplaçant la partie codant pour le peptide signal viral par un peptide signal mycoplasmaïque classique permettant l'adressage à la membrane des lipoprotéines chez les mycoplasmes, espérant ainsi maximiser nos chances d'obtenir un modèle permettant une expression à la surface de la protéine H. Les séquences optimisées sont présentées dans la **Figure 42**.

Séquences 5'-3'

Hopt

1842 pb

27,6 % GC

CCATGGATGTCAGCTCAAAGAGAAAGAAATTAATGCTTTTATAAAGATAATTTACATAATAAACTCATAGAGTTATTTAGATAGAGAA
AGATTAAGTATTGAAAGACCATATATTTTATAGGAGTTTATTTAGTATGTTTTATCATTAATGGATTATAGCTATTGCTGGAATTAG
ATTACATAGAGCTACTGTTGGAAGTCTGAAATCAATCAAGATTAAATCTAATATTGAATTAAGTGAATCAATTGATCATCAAACTAAA
GATGTTTTAACTCCATTATTTAAATTAATGGAGATGAAGTTGGAATTAGAATCCACAAAAATTTTTCAGATTTAGTTAAATTTATTTTCAG
ATAAAATTAAATTTTAAATCCAGATAGAGAATATGATTTTAGAGATTTAAGATGATGTATGAATCCACCAAGAAAGTTAAATTAATTT
TTGATCAATTTTGTGAATATAAGCTGCTGTTAAATCAGTTGAACATATTTTGAATCATCATTAAATAGATCAGAAAGATTAAAGATTATT
AACTTTAGGACCAAGGAAGTGGATGTTTAGGAAGAACTGTTACTAGAGCTCAATTTTCAGAAATTAAGTTTAACTTTAATGGATTTAGATTTA
GAAATGAAACATAATGTTTCATCAGTTTTACTGTTGTTGAAGAAGGATTATTTGGAAGAACTTATACTGTTTGAAGATCAGATACTGGA
AAACCATCAACTTCCAGGAATTTGGACATTTTAAAGATTTTGAATTTGGATTAGTTAGAGATTAGAATAGGAGCTCCAATTTTTC
ATATGACTAATTTTAACTGTTAATATGTCAGATGATTATAGATCATGTTTATTAGCTGTTGGAAGATTTAAATTAAGCTGTTTATGTACT
CCATCAGAACTGTTACTTTATCAGAAATCAGGAGTTCCAAAAAGAGAACCATTAAGTTGTTGTTATTTAAATTTAGCTGGACCAACTTAG
GAGGAGAATTATTCAGTTTTACCAACTACTGATCCAACTGTTGAAAAATTAATTTATCATCACATAGAGGAATTTAAAGATAATGA
AGCTAATTGAGTTGTTCCATCAACTGATGTTAGAGATTACAAAAAAGGAGAATGTTAGTTGAAGCTTGTAAACTAGACCACTC
ATTTTGTAAATGGAAGTGAATTTGGACCATGATCAGAAAGGAAGATTTCCAGCTTATGGAGTTATAGAGTTTCATTAGATTAGCTTCAGA
TCCAGGAGTTGTTTACTTCAGTTTTGGACCAATTAATTTCCACATTTATCAGGAATGCAATTTATATAAATCAATCCATTTTCAAGAGCTGCT
GATTAGCTGTTCCACCATATGAACAATCATTTTAGGAATGATTAATACTATTGGATTTCCAGATAGAGCTGAAGTTATGCCACATATTT
AACTACTGAAATTAGAGGACCAAGAGGAAGATGTCATGTTCCAAATGAATTATCATCAAGAAATGATGATGATATTAATTTGGATCAA
ATATGGTTGTTTACCACTAAAGATTAAAGATATTAATGCTACTTATGATGTTTCAAGATCAGAACATGCTATTGTTTATATATTTAT
GATACTGGAAGATCATCATATATTTTATCCAGTTAGATTAAATTTTAGAGGAATCCATTTATCATTAAAGAAATGAATGTTTCCATGAT
ATCATAAGTTTATGTTATCATGATTGTTAATTTATAATACTATTACTAATGAAGAAGTTCATACTAGAGGATTAACTGGAATTTGAAGT
TACTTGAATCCAGTTTAACTTAAG



Hopt-PS-myc

1740 pb

28 % GC

CCATGGATGAAAAAATTATTAAATTCATTTTCATTAATTTATTATCAGGAGTTGCTGCTACTGTTGTTTCATGTAGATTACATAGAGC
TACTGTTGGAAGTCTGAAATTCATCAAGATTAAATCAATAATTGAATTAAGTGAATCATCAAACTAAAGATGTTTTAACT
CCATTTATTTAAATTAATTTGGAGATGAAGTTGGAATTAGAATTCACAAAAATTTTTCAGATTTAGTTAAATTTATTTTCAGATAAAATTAAT
TTTTAAATCCAGATAGAGAATATGATTTTAGAGATTTAAGATGATGTATGAATCCACCAAGAAAGATTAAATTAATTTGATCAATTTTG
TGAATATAAAGCTGCTGTTAAATCAGTTGAACATATTTTGAATCATCATTAAATAGATCAGAAAGATTAAAGATTAACTTTAGGACCA
GGAAGTGGATGTTTAGGAAGAACTGTTACTAGAGCTCAATTTTCAGAAATTAAGTTTAACTTTAATGGATTAGATTAGAAATGAACAT
AATGTTTCATCAGTTTTACTGTTGTTGAAGAAGGATTATTTGAAGAAGTATACTGTTTGAAGATCAGATACTGGAAGAACCATCAACT
CACCAGGAATTTGGACATTTTAAAGATTTTGAATTTGGAATTTAGTTAGAGATTAGAAATAGGAGCTCCAAATTTTTCATATGACTAATTA
TTTAACTGTTAATATGTCAGATGATTATAGATCATGTTTATTAGCTGTTGGAGAATTAATAAATTAAGTCTTTATGACTCCATCAGAAAT
GTTACTTTATCAGAAATCAGGAGTTCCAAAAAGAGAACCATTAAGTTGTTGTTATTTTAAATTTAGCTGGACCAACTTTAGGAGGAGAATTA
TATTCAGTTTTACCACTACTGATCCAACTGTTGAAAAATTAATTTATCATCACATAGAGGAATTTAAAGATAATGAAGCTAATTGAG
TTGTTCCATCAACTGATGTTAGAGATTACAAAAAAGGAGAATGTTAGTTGAAGCTTGAATAACTAGACCACTCATTTTGTAAATG
GAACTGGAATTTGGACCATGATCAGAAAGGAAGAAATTCAGCTTATGGAGTTATAGAGTTTCAATTAAGTTTATGCTTCAGATCCAGGAGTT
GTTATTACTTCAGTTTTGACCATTAATTTCCATTTATCAGGAATGGATTATATAAATCCATTTTCAAGAGCTGCTTGATTAGCTGT
TCCACATATGAACAATCATTTTAGGAATGATTAATACTATTGGATTTCCAGATAGAGCTGAAGTTATGCCACATATTTTAACTACTGAA
ATTAGAGGACCAAGAGGAAGATGTCATGTTCCAAATGAATTTATCATCAAGAATTTGATGATGATTAATAAATTTGGATCAAAATGTTGTT
TTACCACTAAAGATTAAAGATATTAATGCTACTTATGATGTTTCAAGATCAGAACATGCTATTGTTTATATATTTATGATACTGGAAG
ATCATCATATATTTTATCCAGTTAGATTAAATTTTAGAGGAAATCCATTTATCATTAAAGAAATGAATGTTTCCATGATATCAAAAGTTT
GATGTTATCATGATTGTTTAAATTTATAATACTATTACTAATGAAGAAGTTCATACTAGAGGATTAACTGGAATTTGAAGTTACTTGTAAATCC
AGTTTAACTTAAG

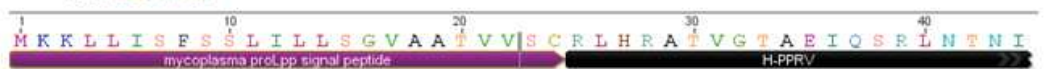


Figure 42 : Séquences optimisées de la protéine H du virus de la PPR (Hopt) et de cette même protéine en remplaçant la partie codant pour le peptide signal viral par une séquence correspondant à un peptide signal mycoplasmique (Hopt-PS-myc).

En vert les sites de restriction *Nco*I en 5' et *Afl*III en 3' ; en rouge les codons start en 5' et stop en 3' ; en bleu le domaine cytoplasmique de la H PPR, en violet les peptides signaux transmembranaire permettant l'ancrage à la membrane des protéines ; en noir les domaines extra membranaires. Il est aussi indiqué le pourcentage en GC des séquences ainsi que leur taille.

II.2 Obtention de mutants *Mmc* H-PPRV

- Réalisation des constructions pMT/Hopt et des pMT/Hopt-PS-myco

Le plasmide pMT/exp et les vecteurs navettes PucSP contenant les séquences H optimisées (**figure 42**) ont été digérés avec les enzymes de restriction *Nco*I et *Afl*III avant d'être ligués de façon orientée et clonés chez *E. coli* (**figure 43**). L'efficacité de cette transformation était d'environ 40% de clones positifs pour l'insertion de H et Hopt-PS-myco. L'intégrité des séquences insérées dans le pMT/exp a été vérifiée par séquençage avant production chez *E. coli* et purification. Les deux plasmides résultant de ce clonage ont été appelés pMT/Hopt et pMT/Hopt-PS-myco.

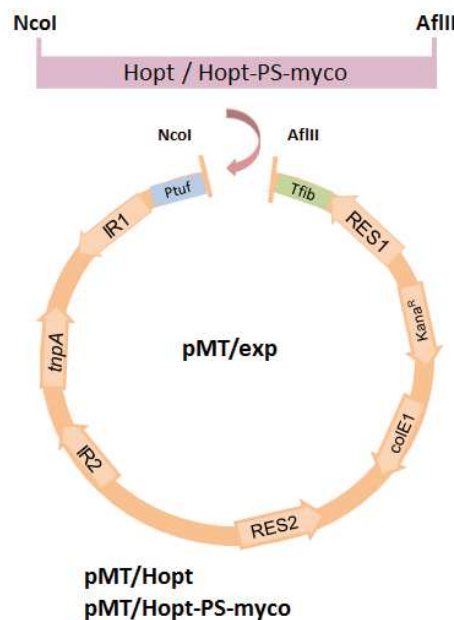


Figure 43 : obtention des pMT/Hopt et pMT/Hopt-PS-myco par digestion enzymatique *Nco*I et *Afl*III du pMT/exp et du vecteur navette contenant les séquences synthétiques optimisées du gène H de la PPR.

- Transformation de *Mmc* et criblage des mutants

Nous avons transformé la souche virulente 7302 de *Mmc* avec ces deux constructions selon la même stratégie que pour les constructions portant les gènes des marqueurs fluorescents. Les clones ont été sélectionnés sur milieu sélectif et la présence du gène H a été vérifiée par PCR. Un séquençage intégral de dix clones positifs pour chacune des deux

constructions a permis de vérifier l'intégrité du système d'expression et des inserts contenant le gène H.

II.3. Vérification de l'expression de la protéine H-PPR par immunodétection classique

L'expression de la protéine H pour cinq clones de chacune des deux constructions, dont les séquences ont été préalablement validées par séquençage, a été examinée par western blot en utilisant un anticorps monoclonal spécifique anti-H. Malheureusement, la protéine H n'a pas pu être mise en évidence malgré un contrôle positif satisfaisant (résultats non montrés). Cet anticorps monoclonal provenait d'un kit de détection ELISA pour la PPR et n'a jamais été vraiment caractérisé, mais il semblerait que l'épitope reconnu par ce monoclonal soit conformationnel (cf. communication personnelle de Geneviève LIBEAU), or, chez les mycoplasmes la protéine H n'a très probablement pas la même conformation à cause des différences dans les systèmes de modification post-traductionnelle entre le mycoplasme et les cellules eucaryotes. Nous avons donc fait le choix de réaliser des « colony blot » et dot blot (ce dernier en conditions native et dénaturée) en utilisant cette fois-ci un sérum polyclonal de chèvre. Là encore, nous n'avons pas pu démontrer la présence de la protéine malgré un contrôle fortement positif.

Le manque de détection de la protéine peut être lié à un problème de sensibilité de la méthode. En effet, le western blot, même avec une révélation par chimioluminescence, reste moins sensible que d'autres approches comme l'immunomarquage à l'or ou la spectrométrie de masse.

Avant de réévaluer l'expression de la protéine avec des méthodes plus puissantes (et aussi plus onéreuses) nous avons décidé de vérifier qu'il n'y avait pas de problème d'instabilité de l'insertion liée à une toxicité de la séquence pour le mycoplasme, voir un défaut lors de la transcription. Nous avons alors procédé à la vérification de la stabilité de la séquence du gène H-PPR et de la présence d'ARN messenger spécifique.

II.4. Vérification de la stabilité de l'insertion

Pour étudier un possible effet délétère de l'expression de la H chez les mycoplasmes, nous avons évalué la stabilité des insertions après dix repiquages successifs des dix clones mutants H-PPR que nous avons validés précédemment par PCR. Les résultats obtenus pour un clone de chaque construction après une PCR spécifique utilisant les amorces pMT85-Spelcloning_F et MT85_F sont regroupés en **figure 44**. Les résultats mettent en parallèle le clone initial (Hopt13 et Hopt-PSmyco6 respectivement) avec 5 clones dérivés obtenus après 10 passages successifs. La même expérience a été faite avec Hopt-PSmyco6.

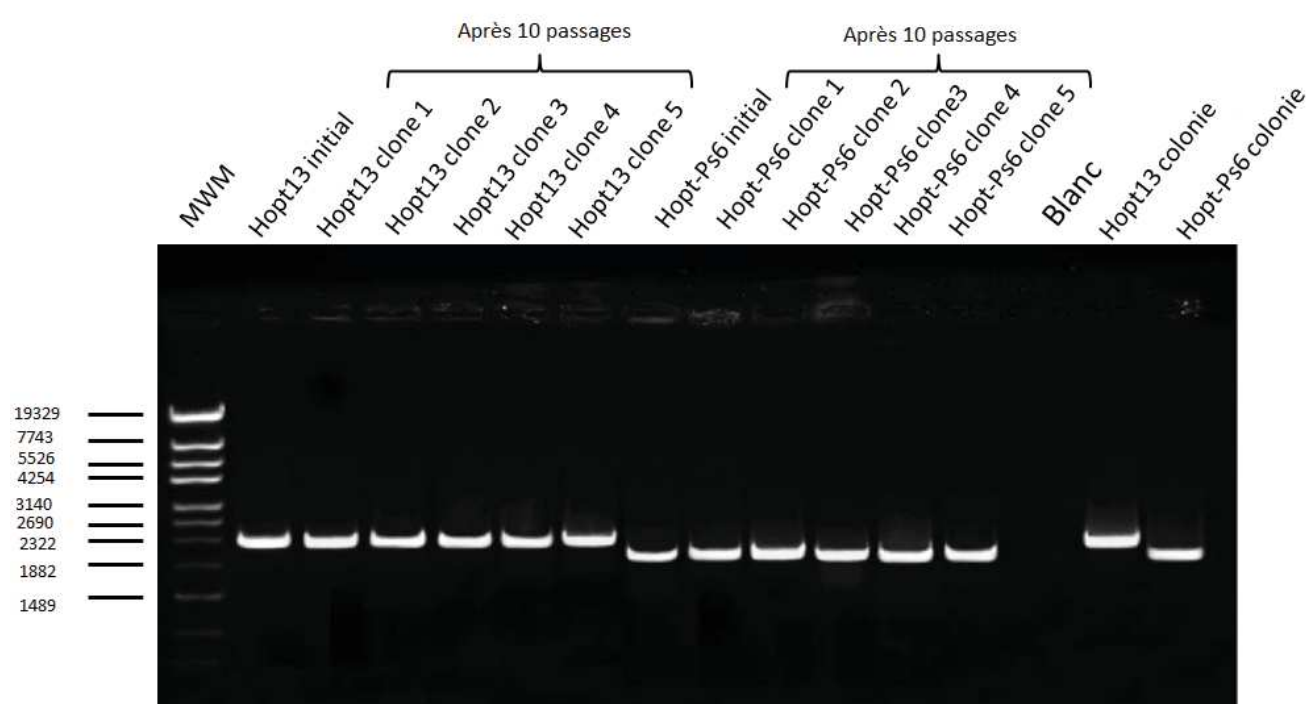


Figure 44 : Vérification de la stabilité de l'insertion du gène de la protéine H chez des mutants de *Mmc*. Gel d'électrophorèse permettant de révéler la taille des produits PCR obtenus avec les amorces amplifiant le système d'expression dans son ensemble. Ces PCR sont réalisées à partir de l'ADN des clones initiaux (Hopt13 et Hopt-PSmyco6) ainsi que de 5 clones de chaque obtenus après 10 passages successifs. La PCR a aussi été effectuée directement à partir des colonies pour les clones initiaux en contrôle supplémentaire.

Après les dix passages, l'insert contenant le gène H de la PPR est toujours présent puisque les PCR effectuées sur les clones après passage se sont toutes révélées positives pour le gène H. Pour vérifier que la séquence du gène n'avait pas subi de modification et était intacte au cours du temps, nous avons séquencé l'ensemble du système d'expression

sur les 5 clones de chaque construction. Ce séquençage n'a pas révélé de mutation dans la séquence virale ni dans la séquence promotrice chez les clones testés après les 10 passages. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence un éventuel souci d'instabilité des séquences H-PPR qui pourrait être associée à une toxicité de la protéine chez les mycoplasmes.

II.5. Vérification de la transcription

Dans l'objectif de vérifier que le manque d'expression de la protéine H chez les mycoplasmes ne vient pas d'un problème lors de la transcription nous avons vérifié la présence du transcrit par RT-PCR. Les ARN totaux ont été extraits, purifiés et rétro-transcrits en ADNc afin de pouvoir révéler la présence d'ARN spécifiques correspondant à la séquence de la protéine H. Pour s'affranchir d'une contamination d'ADN après l'extraction d'ARN qui rendrait nos résultats faussement positifs, nous avons utilisé une DNase. Les ARN traités à la DNase ont été rétro-transcrits et l'ADNc ainsi généré a servi de matrice dans une PCR spécifique du gène de la protéine H. Nous avons réalisé des contrôles sans traitement à la DNase et sans RT-polymérase. Les produits des différentes conditions testées ont été analysés sur gel d'agarose. La présence d'ARN spécifique a bien été confirmée (**figure 45**). Dans cette figure, on peut voir que les clones présentés Hopt13 et Hopt-PS-myc6 ont tous les deux une bande à la taille attendue correspondant à l'ARNm de la protéine Hopt ou Hopt-PS-myc6 dans la condition « ARN + DNase + RT ». Les contrôles effectués en parallèle nous permettent d'exclure des faux positifs puisque le traitement à la DNase est très efficace. De plus, les PCRs effectuées directement à partir des colonies ou à partir des ARN non traités à la DNase (qui contiennent donc de l'ADN) donnent exactement les mêmes bandes que celle obtenue après la RT PCR sur l'ARN. Il y a donc bien une transcription complète de la séquence correspondante aux gènes des protéines H et H-PS-myc6.

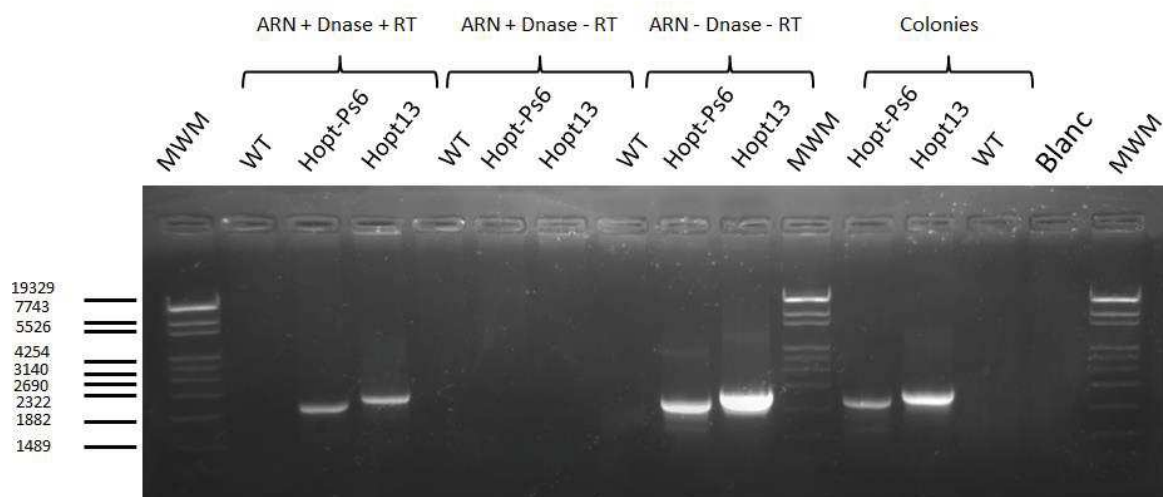


Figure 45 : Gel d'électrophorèse permettant de vérifier la transcription du gène codant pour la protéine H du virus de la PPR dans nos mutants de *Mmc*. Une PCR utilisant les amorces situées au début et à la fin du gène H a été réalisée sur différentes matrices. De gauche à droite sont représentés les marqueurs de poids moléculaire (MWM) suivis des produits PCR obtenus à partir de de l'ARN retro-transcrit en ADNc préalablement traité à la DNase de la souche sauvage 7302 de *Mmc* (WT) et des souches transformées pour exprimer soit la Hopt-PS-myc (ici le clone 6) soit la Hopt (ici le clone 13). En suivant sont présentés les produits amplifiés à partir des différents contrôles de l'expérience : l'ARN non retro-transcrit avec traitement à la DNase pour la vérification de non contamination à l'ADN ; l'ARN non traité à la DNase et non retro-transcrit, qui montre une amplification à partir d'ADN ; et l'ADN directement issu des colonies.

II.6. Vérification de l'expression par spectrométrie de masse

Suite à l'expérience démontrant la présence d'un ARNm pour nos deux constructions, nous avons décidé de vérifier à nouveau la présence de la protéine H par une technique plus sensible. Nous avons donc effectué une détection des peptides par spectrométrie de masse. Nous avons réalisé cette analyse sur les protéines des deux clones de *Mmc* correspondant à chacune des constructions et de la souche sauvage (WT, Hopt13 et Hopt-Ps6). Les clones étudiés avaient été testés précédemment en ce qui concerne la stabilité de leur insertion, avec absence de mutation dans leurs séquences, et la présence d'ARNm spécifique.

Les protéines H qui devaient être exprimées par les clones de *Mmc* transformés avaient une taille théorique de 68 kDa pour Hopt et 64 kDa pour Hopt-PS-myc. Nous avons donc analysé en spectrométrie de masse les protéines des différents clones dont la taille était comprise entre 45 et 80 kDa pour gagner en sensibilité, puisque nous suspicions une

faible quantité de protéines. Néanmoins, l'analyse n'a pas permis de révéler des peptides appartenant à la protéine H du virus de la PPR dans le protéome des mutants *Mmc*. Tous les peptides identifiés appartenaient uniquement à *Mmc*. Nous n'avons pas jugé utile de refaire l'analyse avec les protéines de taille inférieure car s'il y avait eu une production de protéine tronquée elle ne serait pas un bon candidat pour la production d'anticorps neutralisants.

Nous avons cherché à révéler la présence de la protéine sur le mycoplasme dans son ensemble en travaillant sur les protéines totales présentes dans les culots des cultures lavés. L'absence de la protéine H observée alors que de l'ARNm spécifique a été mis en évidence chez les mycoplasmes transformés soulève l'hypothèse d'un éventuel relargage extracellulaire de la protéine. Il faudrait donc exclure la présence de la protéine H dans le milieu extracellulaire, même si ceci est peu probable en raison de la présence de peptides signal (dont un typique des lipoprotéines des mycoplasmes) qui devraient induire une translocation à la membrane cellulaire.

Quoi qu'il en soit, pour la preuve de concept d'un vaccin multivalent que nous voulions obtenir, il aurait fallu une expression suffisante de la protéine virale pour espérer avoir une réponse immunitaire protectrice chez les animaux. Cet outil n'est donc pas actuellement utilisable en l'état pour un essai vaccinal. Alors, par soucis d'éthique et du bien-être animal, nous n'avons pas mis en place les essais d'immunisation *in vivo*.

III Conclusion et perspectives

Nous avons réussi à insérer dans le génome de *Mmc* une construction portant un gène viral optimisé pour une expression chez les mycoplasmes à l'aide de notre système d'expression pMT/exp. La séquence du gène de la protéine H du virus de la PPR a été optimisée pour réduire le risque de reconnaissance d'ADN étranger par le mycoplasme. Dans une première construction l'intégralité du gène a été clonée dans notre système d'expression. Nous avons aussi réalisé une seconde construction en remplaçant le peptide signal de la protéine H par celui d'une lipoprotéine endogène de *Mmm* pour favoriser l'adressage à la surface du mycoplasme. Nous n'avons malheureusement pas pu révéler d'expression de la protéine H chez *Mmc* malgré la stabilité des séquences insérées au cours des passages et la présence d'ARNm spécifique, et ce pour les deux constructions réalisées.

Plusieurs raisons peuvent expliquer que nous n'ayons pas mis en évidence la protéine. La présence d'ARNm spécifique indique que la transcription a bien eu lieu, donc nous devons plutôt soupçonner des soucis de stabilité de ces ARNm et d'inefficacité dans la traduction, ou des problèmes dans le repliement de la protéine, voire une dégradation très rapide de celle-ci. La protéine peut ainsi être mal traduite (voire pas traduite) à cause des structures secondaires de l'ARNm, ou être en quantité trop faible pour permettre sa détection.

Une étude a mis en évidence un mécanisme à caractère général (ribosome en *stand-by*) qui contrôle la traduction de l'information contenue dans un certain gène, et cela en fonction des besoins cellulaires (Marzi et al., 2007). On peut éventuellement penser à un phénomène similaire de régulation négative de la traduction chez *Mmc*.

Si nous avons démontré l'expression de la H-PPR chez le mycoplasme, la suite aurait été de localiser la protéine dans la cellule mycoplasmaïque, par exemple par microscopie électronique avec immunomarquage à l'or. Puis, il aurait fallu prendre en considération le fait que les mycoplasmes ne sont pas capables de toutes les modifications post-traductionnelles qui ont lieu chez les cellules eucaryotes. Donc même si la traduction avait eu lieu, la protéine n'aurait pas forcément la conformation classiquement retrouvée chez son hôte naturel. La protéine H du virus de la PPR nécessite moins de modifications post-traductionnelles et c'est pour cela que nous l'avons choisie. Il s'agit d'une glycoprotéine, donc il fallait envisager une possible glycosylation par le mycoplasme. Comme d'autres mycoplasmes, les membres du groupe mycoides possèdent des glycosyltransférases et produisent des polysaccharides et des glycolipides (Bertin et al., 2015). La production de glycoprotéines par les mycoplasmes a aussi été démontrée chez trois espèces pathogènes de la souris et de l'homme (Jordan et al, 2014), mais ces composants n'ont pas encore été caractérisés chez le groupe mycoides. En tout cas, ces résultats montraient que les mycoplasmes possèdent des glycomes bien plus complexes qu'initialement envisagé et nous avaient encouragé à tenter l'expression d'une protéine glycosylée.

Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à faire exprimer une protéine virale chez les mycoplasmes pour en faire une preuve de concept de l'utilisation de ces bactéries comme vecteur vaccinal. Cet échec met en évidence des difficultés à envisager

pour l'expression hétérologue de protéines complexes chez les mycoplasmes. Aussi, très peu de choses sont connues sur la régulation de l'expression de gènes, ainsi que sur les modifications post-traductionnelles chez les mycoplasmes, mais ces modifications devront absolument être prises en considération lors de la sélection des protéines à exprimer. Des essais de développement de vaccin multivalent pourraient toujours être envisagés en associant plusieurs valences mycoplasmiques ou d'autres bactéries, voire des protéines virales plus simples, pour limiter les problèmes de traduction et de modification des protéines.

Partie III Conclusions et perspectives générales

Les mycoplasmes sont responsables d'importantes maladies chez les animaux et chez l'homme mais les mécanismes de virulence de ces bactéries restent mal connus. L'unité ASTRE est laboratoire de référence international OIE et FAO pour la PPCB et la PPCC. Sa mission est donc d'améliorer le contrôle de ces maladies, qui sont toujours des causes majeures de pertes économiques pour l'élevage de ruminants en Afrique (et aussi en Asie pour la PPCC). Sur le terrain, plusieurs stratégies de contrôle sont utilisées mais aucune d'elles n'est parfaitement satisfaisante. Les traitements antibiotiques des animaux atteints permettent la disparition des symptômes mais peuvent conduire à des formes chroniques de maladie et favorisent l'apparition de bactéries antibio-résistantes, surtout dans les conditions sous optimales dans lesquelles ils sont administrés sur le terrain. Les vaccins utilisés aujourd'hui pour le contrôle de ces maladies ont été produits empiriquement (souches atténuées pour la PPCB et bactéries adjuvées pour la PPCC). Les vaccins PPCB ne confèrent pas une protection suffisamment durable dans le temps et sont occasionnellement associés à des réactions post-vaccinales. En ce qui concerne les vaccins PPCC, ils sont chers à produire dû au caractère fastidieux de l'agent pathogène et sont de ce fait très rarement administrés sur le terrain. La compréhension des mécanismes de pathogénicité de ces maladies faciliterait le développement de vaccins de nouvelle génération plus efficaces (mutants atténués ou sous unités conférant une protection optimale). Aussi, l'utilisation des mycoplasmes comme vecteurs vaccinaux exprimant plusieurs valences permettrait de réduire énormément le cout global de l'immunisation des animaux contre différents agents pathogènes et de promouvoir ainsi la vaccination contre ces maladies négligées.

Cette thèse comportait deux objectifs principaux. Le premier objectif était de mieux comprendre les interactions des mycoplasmes avec leurs cellules hôtes afin d'élucider les mécanismes d'invasion et de persistance des mycoplasmes : adhésion, pénétration, survie et multiplication. Pour cela, nous voulions produire des mycoplasmes fluorescents pour faciliter les études de co-localisation avec les cellules cibles. Le second objectif était d'évaluer les mycoplasmes comme vecteurs vaccinaux en utilisant le modèle de la peste des petits

ruminants (PPR), une maladie virale qui affecte les chèvres et présente un impact et une distribution similaire à la PPCC. La production de mycoplasmes recombinants exprimant des antigènes de surface du virus de la PPR servait donc de preuve de concept d'un vaccin multivalent.

La réalisation de ces deux objectifs reposait sur une stratégie commune : l'expression hétérologue de gènes par le mycoplasme. Les premiers travaux de cette thèse ont alors été dédiés au développement et validation d'un système d'expression de gènes pour ces bactéries. Une cassette permettant l'expression de gènes sous le contrôle du promoteur *tuf* de *Mmm* a ainsi été obtenue et intégrée dans le plasposon pMT85/2res pour insertion stable, au hasard, dans le génome des mycoplasmes.

Pour vérifier la fonctionnalité du nouveau système, appelé pMT/exp, chez *Mmm* nous y avons cloné la séquence d'une prolipoprotéine de cette espèce, puis nous avons transformé une souche mutante de *Mmm* déficiente pour cette protéine. La restauration de l'expression de la lipoprotéine a été vérifiée par western blot et a ainsi permis de valider le système pour l'expression de gènes homologues chez *Mmm*.

Ces résultats encourageants nous ont permis de nous lancer dans l'expression de gènes hétérologues chez *Mmm*. Nous avons utilisé en première intention le pMT/exp pour l'expression de marqueurs fluorescents. Pour cela, nous avons choisi quatre protéines fluorescentes distinctes afin d'optimiser les champs d'utilisation possibles en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques (GFP2, mNeongreen, mKO2 et mCherry). Les souches *Mmm* transformées avec les marqueurs fluorescents ont été étudiées par microscopie d'épifluorescence et cytométrie en flux (pour les fluorochromes émettant dans le vert) afin de déterminer l'intensité de fluorescence des différents marqueurs. L'expression s'est avérée largement suffisante pour tous les marqueurs, excepté la GFP2, et a permis notamment d'observer des colonies vertes, oranges et rouges par microscopie de fluorescence à partir des transformants mNeonGreen, mKO2 et mCherry, respectivement. Le niveau de fluorescence verte des mutants GFP2 et mNeonGreen a été ensuite évalué par cytométrie en flux et s'est avéré très satisfaisant pour mNeonGreen.

Les mêmes constructions (exceptée celle contenant le gène de la GFP2) ont été utilisées pour transformer une souche de *M. bovis*, un mycoplasme phylogénétiquement

éloigné du groupe mycoides. Le système d'expression s'est révélé très efficace aussi chez cette espèce (niveaux d'expression de fluorescence quantifiés par cytométrie en flux équivalents à ces obtenus chez *Mmm*), démontrant ainsi la versatilité du système d'expression plus généralement chez les mycoplasmes.

Dans ces travaux de thèse nous voulions utiliser les mycoplasmes fluorescents principalement pour faire des études d'interaction avec les cellules de l'hôte. Alors, afin de déterminer si les mycoplasmes fluorescents permettraient ce type d'étude, des macrophages bovins ont été infectés avec des clones mNeonGreen de *Mmm* et *M. bovis*, puis analysés par microscopie confocale et cytométrie en flux. Les mycoplasmes fluorescents étaient bien détectables dans les phagocytes par les deux méthodes et leur niveau de fluorescence était suffisant pour permettre l'observation de mycoplasmes individuels à l'intérieur des cellules par microscopie confocale.

Nous avons commencé ensuite à nous intéresser au comportement de *Mmm* et *M. bovis* vis-à-vis de différentes cellules hôtes dans un objectif d'étude fonctionnelle comparative, afin d'élucider les mécanismes d'invasion et de persistance de *Mmm* par rapport à *M. bovis*, pour lequel des données d'invasion et persistance dans différentes cellules de l'hôte étaient déjà disponibles.

Nous voulions étudier les interactions avec des cellules non phagocytaires pulmonaires bovines (épithéliales, endothéliales et fibroblastiques). On voulait savoir si, comme *M. bovis*, *Mmm* adhère et éventuellement envahit ces cellules et nous voulions étudier la prolifération de ces deux espèces à l'intérieur ou aux abords des cellules. Ceci nous permettrait de savoir si ces cellules peuvent jouer un rôle de réservoir protectif vis-à-vis de la réponse immunitaire et des traitements antibiotiques, permettant ainsi la persistance de l'infection.

Nous avons donc commencé par l'infection d'une lignée cellulaire épithéliale pulmonaire bovine embryonnaire (EBL) qui était disponible au laboratoire. Celle-ci a confirmé que seul *M. bovis* était capable d'adhérer en grand nombre et de pénétrer en petit nombre après deux heures d'infection à une MOI de 100. Le manque d'adhérence de *Mmm* à une lignée embryonnaire tel que nous l'avons montré ici a déjà été décrit (Aye et al., 2015).

Les auteurs ont considéré que ceci expliquerait l'absence de maladie chez les jeunes individus. En effet ils ont émis l'hypothèse que l'adhérence se ferait par un ligand ou un récepteur qui n'est pas encore mature sur ces lignés embryonnaires. L'adhérence de *Mmm* à d'autres types cellulaires devra être évaluée dans des futurs travaux. En tout cas, nous avons pu montrer que ce type d'analyse peut permettre de mettre en évidence des différences d'adhésion et invasion entre espèces, souches ou mutants fluorescents à différentes cellules. Puisque notre outil de marquage est parfaitement adapté à la construction de banques de mutants, il serait aussi intéressant de développer une méthode de criblage permettant l'identification de mutants déficients en termes d'adhérence, invasion et prolifération, pour la mise en évidence de nouveaux facteurs de virulence. Pour cela il faudrait une méthode d'analyse quantitative rapide comme la fluorimétrie pour l'analyse haut débit des interactions avec les cellules hôtes.

En ce qui concerne les interactions entre *M. bovis* et *Mmm* et les macrophages, les résultats de titrage ont montré qu'en l'absence d'opsonines les macrophages sont capables de contrôler, mais pas éliminer complètement, l'infection *in vitro* par les deux mycoplasmes après 72h d'incubation. A la plus faible MOI, ce contrôle est plus efficace pour *Mmm* dont le titre chute de 2-3 logs entre 0 et 72h, que pour *M. bovis*, dont le titre se maintient. La microscopie confocale nous a permis de confirmer et d'illustrer certaines observations, parfois hypothétiques ou partielles, obtenues par titrage. Tout d'abord, elle a confirmé qu'il y a bien eu une internalisation des mycoplasmes par les macrophages malgré l'absence d'opsonisation spécifique. Ensuite elle a conforté l'idée que *M. bovis* résiste mieux que *Mmm* à l'élimination par les macrophages en mettant en évidence une accumulation de mycoplasmes intracellulaires au cours du temps. Enfin, la capacité plus forte d'adhérence au support de culture de *M. bovis* comparé à *Mmm* est très bien illustrée par la microscopie confocale. Cependant, si cette adhérence au support explique en partie la capacité de survie plus élevée de *M. bovis*, nous avons pu démontrer une survie intracellulaire pour les deux mycoplasmes. Bien évidemment, ces résultats devront être confirmés sur d'autres souches virulentes que celles utilisées dans ce travail. De plus, il serait intéressant de comparer le comportement de différents types de macrophages tels que les macrophages alvéolaires et les macrophages différenciellement activés (M1 versus M2). Enfin, dans une optique de dissémination des mycoplasmes et de persistance de l'infection, les cellules dendritiques

revêtent un intérêt tout particulier de par leur capacité à migrer vers les ganglions lymphatiques drainant les tissus infectés.

Le deuxième axe de cette thèse était la réalisation d'une preuve de concept de l'utilisation des mycoplasmes en tant que vecteurs vaccinaux. Cette partie, qui consistait en l'expression d'antigènes viraux par les mycoplasmes afin d'obtenir un vaccin bivalent, s'est avérée moins prometteuse qu'initialement prévue. Nous avons choisi de faire exprimer à *Mmc*, un mycoplasme du groupe mycoides infectant les caprins, la protéine H du virus de la PPR. Ces deux pathogènes ont une répartition géographique et des hôtes similaires. L'hémagglutinine est à la base du développement d'une immunité protectrice et a déjà été utilisé dans des vaccins recombinants. Nous voulions donc faire exprimer la protéine H par les mycoplasmes dans le but de faire un vaccin qui protégerait les animaux contre les deux maladies. Le système d'expression pMT/exp a donc été utilisé pour exprimer le gène de la H optimisé selon l'usage préférentiel de codons chez les mycoplasmes. Nous avons aussi remplacé la partie 5' de la séquence du gène, qui correspond à la zone d'ancrage de la H dans la membrane cellulaire, par une séquence correspondant au peptide signal d'une pro-lipoprotéine mycoplasmaïque pour favoriser l'adressage à la surface du mycoplasme. Nous avons cloné ces séquences dans pMT/exp, puis nous avons transformé avec les deux constructions résultantes une souche virulente de *Mmc*. Un séquençage intégral des inserts de différents clones de transformants correspondant à chacune des deux constructions a permis de vérifier l'intégrité du système d'expression, et ceci après dix repiquages de plusieurs clones. Aucune mutation n'a été mise en évidence dans la séquence virale ni dans la séquence promotrice, démontrant ainsi la stabilité des inserts. La présence d'ARN spécifique a aussi été confirmée par RT-PCR, indiquant que le problème ne venait pas de la transcription du gène. Cependant, l'expression de la protéine chez les mutants de *Mmc* n'a pas pu être mise en évidence ni par des méthodes d'immunodétection classique ni par des moyens de détection de peptides très sensibles à travers la spectrométrie de masse.

Ces travaux de thèse ont permis de développer un outil universel pour l'expression de gènes chez les mycoplasmes. L'utilisation de cet outil pour l'expression de gènes de fluorescence par les mycoplasmes est particulièrement intéressante et prometteuse car cet outil permettra l'étude *in vitro* des mécanismes de pathogénicité via l'étude d'interaction

avec les différentes cellules hôtes. De plus, la compréhension des mécanismes d'invasion et de persistance chez l'hôte est essentielle pour une meilleure appréhension de la pathogénèse des infections à mycoplasmes. Ainsi l'outil développé au cours de cette thèse est parfaitement adapté aux études *in vivo*, puisque l'expression de fluorescence par le mycoplasme est stable et constitutive en l'absence de pression de sélection antibiotique et le marqueur de sélection peut être éliminé par un traitement à la résolvasse. De ce fait, les mycoplasmes marqués peuvent être détectés directement dans les tissus, permettant les suivis de cinétiques d'infection à la fois *ex vivo* par examen histologique et *in vivo* par imagerie sur petit animal (chez des pathogènes de ces animaux où un modèle petit animal de laboratoire existe) comme cela a déjà été fait chez d'autres bactéries (Zelmer et al., 2012). Il est aussi possible de marquer les mycoplasmes en différentes couleurs pour réaliser des analyses d'infection multiples (Ling et al., 2000). De plus, l'émission de fluorescence peut être quantifiée et corrélée de façon quantitative à la concentration en mycoplasmes fluorescents dans le cadre d'analyses très diverses en dehors des interactions avec les cellules de l'hôte. Cette méthode peut remplacer le titrage avec un gain de temps certain dans des applications variées comme le criblage de sensibilité à différents inhibiteurs comme les antibiotiques, notamment pour l'étude d'acquisition d'antibiorésistance. Pour terminer, l'outil peut aussi être facilement modifié afin d'exprimer une protéine d'intérêt directement en fusion avec la protéine fluorescente, monomérique. Cette étiquette permettra de localiser aisément et suivre la protéine d'intérêt dans des études fonctionnelles. Pour conclure, le champ d'application pour l'utilisation des mycoplasmes fluorescents est très vaste et mérite d'être approfondi avec ce nouvel outil.



Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades



Tiffany Bonnefois^{a,b}, Marie-Stéphanie Vernerey^c, Valérie Rodrigues^{a,b}, Philippe Totté^{a,b}, Carinne Puech^{a,b}, Chantal Ripoll^d, François Thiaucourt^{a,b}, Lucía Manso-Silván^{a,b,*}

^a CIRAD, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France

^b INRA, UMR1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France

^c INRA, Joint Research Unit 385 UMR BGPI, Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

^d INSERM U1051—Hôpital Saint Eloi INM. 80, rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2016

Received in revised form 27 July 2016

Accepted 4 August 2016

Available online 4 August 2016

Keywords:

Mycoplasma

Fluorescence Whole

cell labelling

Host-pathogen interactions

Flow cytometry

Confocal microscopy

ABSTRACT

Fluorescence expression tools for stable and innocuous whole mycoplasma cell labelling have been developed. A Tn4001-derivative mini-transposon affording unmarked, stable mutagenesis in mycoplasmas was modified to allow the constitutive, high-level expression of mCherry, mKO2 and mNeonGreen. These tools were used to introduce the respective fluorescent proteins as chromosomal tags in the phylogenetically distant species *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* and *Mycoplasma bovis*. The production, selection and characterisation of fluorescent clones were straightforward and resulted in the unprecedented observation of red and green fluorescent mycoplasma colonies in the two species, with no apparent cytotoxicity. Equivalent fluorescence expression levels were quantified by flow cytometry in both species, suggesting that these tools can be broadly applied in mycoplasmas. A macrophage infection assay was performed to assess the usefulness of mNeonGreen-expressing strains for monitoring mycoplasma infections, and notably cell invasion. The presence of fluorescent mycoplasmas inside live phagocytic cells was detected and quantified by flow cytometry and corroborated by confocal microscopy, which allowed the identification of individual mycoplasmas in the cytoplasm of infected cells. The fluorescence expression tools developed in this study are suitable for host-pathogen interaction studies and offer innumerable perspectives for the functional analysis of mycoplasmas both *in vitro* and *in vivo*.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The class *Mollicutes* constitutes a group of wall-less bacteria with a small genome size, commonly referred to as mycoplasmas, which evolved from gram-positive bacteria with low GC

content through a process of massive genome reduction (Razin et al., 1998). Since they represent the smallest organisms capable of autonomous replication, they have served as models for the definition of the minimal gene set required for independent life, leading to the generation of a “minimal” artificial cell by synthetic biology (Hutchison et al., 2016). Through the course of reductive evolution mycoplasmas lost many metabolic capabilities and adapted to a commensal or parasitic mode of life. As a consequence, many species are known as important pathogens of humans, animals, and plants. However, despite the apparent simplicity of their small genomes, mycoplasmas have developed sophisticated mechanisms for colonisation and persistence in their host (Browning et al., 2014). Still, these mechanisms remain virtually unknown for most species and, although increasing amounts of genome sequence data have accumulated over the last two decades, the functional analysis of mycoplasmas has lagged far behind that of other eubacteria.

Abbreviations: cfu, colony forming units; GFP, green fluorescent protein; MFI, median fluorescence intensity; mRFP1, monomeric red fluorescent protein; MOI, multiplicity of infection; *Mmm*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*; PBS, phosphate buffered saline; PMT1, photomultiplier tube 1; PFA, paraformaldehyde; PI, propidium iodide; RT, room temperature; VSD, variable secondary dichroic.

* Corresponding author at: CIRAD, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France.

E-mail addresses: tiffany.bonnefois@gmail.com (T. Bonnefois),

marie-stephane.vernerey@supagro.inra.fr (M.-S. Vernerey),

valerie.rodrigues@cirad.fr (V. Rodrigues), philippe.totte@cirad.fr

(P. Totté), carinne.puech@cirad.fr (C. Puech), chantal.ripoll@inserm.fr

(C. Ripoll), francois.thiaucourt@cirad.fr (F. Thiaucourt), lucia.manso-silvan@cirad.fr

(L. Manso-Silván).

The analysis of bacterial gene expression and function is dependent on the availability of tools for the genetic manipulation of these bacteria, typically allowing the production of mutants and the expression of gene products such as selection markers, reporter systems or specific genes for mutant complementation. Yet, this has been hindered by the incompatibility of vectors engineered in conventional bacteria, together with difficulties encountered in the development of specific genetic tools for these peculiar organisms (Renaudin et al., 2014). Significant limiting factors include the scarcity of natural plasmids and selective antibiotic resistance markers and the slow, fastidious growth of cultivable mycoplasmas. However, setting aside the latest developments in synthetic biology allowing the engineering of bacterial genomes in yeast and their transplantation in recipient cells (Hutchison et al., 2016), numerous tools are now available for the simple genetic manipulation of these long considered intractable organisms. A comprehensive review of these tools, and their contributions to the functional genetic analysis of mycoplasmas, has been recently published (Renaudin et al., 2014). Notable examples include sophisticated systems for random insertional mutagenesis derived from the transposon Tn4001 of *Staphylococcus aureus*. These mini-transposons have been improved by placing the transposase gene outside the transposable element, which prevents re-excision and secondary transposition, conferring stability to the insertions (Zimmerman and Herrmann, 2005). Another interesting improvement has been the combined use of these mini-transposons with the μ D TnpR/res recombination system to excise the antibiotic resistance gene from the mycoplasma chromosome after transposition in order to produce unmarked mutations (Janis et al., 2008). Also, artificial plasmids using the origin of replication of the mycoplasma chromosome (*oriC*) have been used to allow gene cloning and expression in a variety of mycoplasma species (Renaudin et al., 2014). However, the host range of *oriC* plasmids is circumscribed to closely related species and there is not a single self-replicating vector for universal use in mycoplasmas. The wide host range of Tn4001 transposition in mycoplasmas has been exploited to overcome the lack of plasmid vectors in some species and mini-transposons have been modified to allow gene delivery and expression (Zimmerman and Herrmann, 2005). These systems have been used to express fluorescent proteins in fusion with mycoplasma proteins, serving as reporters of gene expression and allowing the subcellular localisation of mycoplasma components (Balish et al., 2003; Kenri et al., 2004; Tulum et al., 2014; Zimmerman and Herrmann, 2005). However, the successful expression of fluorescent proteins in mycoplasmas remains rare and, to our knowledge, there are no fluorescence expression systems available to monitor the dynamics of mycoplasma infections *in vivo* or *in vitro*.

The aim of this work was to extend the array of molecular tools for use in *Mollicutes*, notably through the development of universal fluorescence expression systems for whole mycoplasma cell labelling allowing the monitoring of mycoplasmas during the course of infection. The level of fluorescence conferred to the mycoplasmas should be sufficient to enable their direct detection inside host cells using affordable techniques such as confocal microscopy and flow cytometry, thus allowing the analysis of the mechanisms involved in colonisation and persistence inside the host (e.g., adhesion, invasion, survival and multiplication inside host cells). For this purpose, a Tn4001-derivative mini-transposon affording stable, random mutagenesis in a variety of mycoplasma species was modified to allow the constitutive, high-level expression of green and red fluorescent proteins in mycoplasmas. The species *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) and *Mycoplasma bovis*, known as important cattle pathogens but belonging to distant phylogenetic groups (Sirand-Pugnet et al., 2007), were used to demonstrate the broad spectrum of the fluores-

cence expression tools for use in mycoplasmas and a macrophage infection assay was performed to show that fluorescent mycoplasmas could be directly detected inside host cells, thus demonstrating the usefulness of these new tools for the study of host-mycoplasma interactions.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Competent DH10 β -derivative *Escherichia coli* strain NEB 10- beta (New England Biolabs, USA) was used for plasmid cloning and propagation according to the supplier's instructions, with 100 μ g/mL kanamycin added to the culture medium for selection of transformants.

Mmm type strain PG1^T (CIRAD, France) was used for PCR amplification of the intergenic region containing the *tufA* promoter. The two pathogenic mycoplasma strains used in this study were bovine lung isolates from cases of pneumonia and subjected to few *in vitro* passages. *Mmm* strain 8740-Rita was isolated from a contagious bovine pleuropneumonia case in Cameroon, in 1987 (Dr. Aboubakar, Laboratoire National Vétérinaire, Garoua, Cameroon).

M. bovis strain Oger2 was isolated from a case of calf pneumonia in Ardennes, France, in 1975 (CIRAD, France). All strains were cultured at 37 °C, 5% CO₂ in modified Hayflick's medium: 2.1% PPLO broth without crystal violet (Difco, USA), 15% horse serum de-complemented for 1 h at 56 °C, 5% fresh baker's yeast extract, 0.2% sodium pyruvate, 0.1% glucose, with 1% Noble Agar (Difco, USA) added for plating.

2.2. Plasmid constructions

2.2.1. DNA techniques

Plasmid DNA was extracted using either the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA) or the EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA) depending on required DNA yield. Standard molecular techniques were used for plasmid constructions, using the following reagents according to the manufacturer's instructions. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs, USA. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase and T4 DNA ligase were purchased from Invitrogen, Life Technologies, USA. One microgram of plasmid DNA was dephosphorylated with 1 unit of CIAP during 5 min at 37 °C. Ligation was performed according to the manufacturer's recommendations for blunt cloning. Genomic DNA was extracted from bacterial cultures at the end of the exponential phase using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA). All oligonucleotides used in this study (Table 1) were obtained from Sigma-Aldrich, France. To minimize mutations caused by PCR amplification, high fidelity Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) was used for DNA cloning experiments. Otherwise, TopTaq DNA Polymerase (Qiagen, USA) was used for PCR verifications and prior to sequencing. DNA sequencing was performed by Beckman Coulter Genomics, Takeley, UK.

2.2.2. Construction of fluorescence expression tools

The strategy for the development of fluorescence expression tools is presented in the results section. Plasmids pMT85/2res and pPS3.1 were kindly provided by Pascal Sirand-Pugnet (INRA, Bordeaux, France) and all primer sequences are listed in Table 1. pMT85/2res was modified by cloning a cassette constructed using the overlap extension PCR technique. The entire intergenic sequence preceding the elongation factor Tu gene (*tufA*) followed by the first 33 nucleotides in its 5' end, was amplified by PCR from the genomic DNA of *Mmm* strain PG1^T using primers SpeI P_{tuf} F and NcoI. P_{tuf}+R. The transcription terminator sequence of the

Table 1

Oligonucleotides used in this study.

Name	Nucleotide sequence (5'-3')
SpeI Ptuf F	TTTACTAGTTATTTTGAATTAAGTATTAAATAAGTG
NcoI Ptuf+ R	TTTCCATGGAGGTAACACTACGGTCAAATTG
MCS Ptuf+ Tfib.F	GTAGTTTACCTCCATGAAAGTCGACCCGCGCTTAAGAAATTAAGTTGGTTCATTC
Tfib XbaI R	GGGCTAGATTAAAAAATAAAAAACAACCTTTTGG
TnpA-F	GTTCTTATGGACCTACATGATG
pMT85-Spelcloning F	AACCCATAGCTTTGGACACAC
Adapt1BclI	CTCGTACGTGGGATCGTAACGTT
Adapt2BclI	GATCAACGTTACGATCCC
BclI-Primer	CGTGGGATCGTAACGTTGATCA
MT85-R	CCGCCTTGTAGTGAGCTGATACC

fibril protein gene *fib* of *Spiroplasma citri* was amplified from plasmid pPS3.1 using primers MCS Ptuf+ Tfib F and Tfib XbaI R. The resulting products were hybridised to each other and extended by primer-free amplification. A final PCR was performed to amplify this last product using primers SpeI Ptuf E and Tfib XbaI R. All PCR reactions consisted in initial denaturation at 98 °C for 30 s, followed by 35 cycles of denaturation at 98 °C for 7 s, annealing at 57 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 30 s, finished by a final extension at 72 °C for 5 min. The only exception was the primer-free amplification, for which only 12 PCR cycles were performed. The resulting cassette was double-digested with *SpeI* and *XbaI* and cloned in the *SpeI* site of pMT85/2res, resulting in plasmid pMT/exp. The entire cloned sequence was verified by DNA sequencing with primer TnpA-F. The pMT/exp plasmid map, annotated sequence and FASTA sequence are presented in Suppl. Fig. 1.

The gene sequences of mCherry, mKO2 and mNeonGreen were retrieved from NCBI GenBank database (Table 2). These nucleotide sequences were optimised taking into consideration the codon usage bias in mycoplasmas (Suppl. Table 1). An in-house bioinformatic tool was developed at CIRAD to automate codon optimisation. This tool is freely available from the authors on request. The Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>; last accessed 24/06/2016) (Nakamura et al., 2000) was used to analyse the frequency of codon use in the query organism “*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC str. PG1 [gbbct]: 1016 CDS's (330,592 codons)”. The most frequently used codon for each amino acid (Suppl. Table 1) was selected for implementation in the bioinformatic tool. Synthetic constructs corresponding to mycoplasma-optimised gene sequences of each of the three fluorescent proteins were produced by ProteoGenix (Schiltigheim, France). The *NcoI* and *AflIII* recognition sites were included at the extremities of the different fluorescent genes to allow directional cloning in pMT/exp, resulting in plasmids pMT/mNeonGreen, pMT/mCherry and pMT/mKO2. The cloned inserts were entirely validated by sequencing with primer pMT85-Spelcloning E (Table 1).

2.3. *Mycoplasma* transformation and identification of transposon insertion sites

PEG-mediated transformation of mycoplasma strains was performed as described (Janis et al., 2008) with a few modifications. Twenty micrograms of pMT85/2res-derived plasmids were used to transform approximately 10^9 mycoplasma cells. Transformed cells were re-suspended in 500 μ L broth and incubated for either 2 h (*M. bovis*) or 3 h (*Mmm*) at 37 °C, then plated (100 μ L) on solid Hayflick's medium supplemented with kanamycin (100 and 200 μ g/mL for *Mmm* and *M. bovis* respectively). Ten-fold dilutions were also plated (20 μ L drops) for culture titrations with and without antibiotics in order to calculate the transformation efficiency, expressed as the number of transformant colony forming units (cfu) per total cfu. Selected fluorescent colonies were picked and grown in selective

broth, filtered through a Millex HV 0.45 μ m Durapore PVDF membrane (Merk Millipore, Ireland) and plated on solid medium for cloning. Filter-cloned mutant cultures were stored at –80 °C for further analysis. Subsequent cultures were performed in non-selective medium.

To sequence the site of the transposon insertion in the *Mmm* genome, total DNA from selected clones was digested with *BclI*. An adaptor was generated by hybridisation of 100 μ M of oligonucleotides “Adapt1BclI” and “Adapt2BclI” (Table 1) at 100 °C during 5 min, then ligated to *BclI*-digested mycoplasma DNA. The ligation product was used as template for PCR amplification using primers BclI-Primer and MT85-R (Table 1). Standard reactions were used during 35 PCR cycles with hybridisation at 52 °C. The PCR product was then sequenced using primer MT85-R. The resulting sequences were analysed using Geneious R6 6.0.1 (Biomatters Ltd, New Zealand). After elimination of flanking mini-transposon sequences, the insertion site sequence was obtained by mapping with the available genome sequence of *Mmm* PG1^T (GenBank accession no. BX293980.2).

2.4. Macrophage isolation and infection

Blood samples were collected from healthy Jersey cattle kept in an animal housing facility (CIRAD, Montpellier, France). Whole blood was collected from the jugular vein in heparinised BD Vacutainer tubes (Beckton Dickinson, USA) according to the manufacturer's instructions. Experimental procedures for animal maintenance and blood sampling were approved by the Languedoc-Roussillon regional ethics committee (French CE-LR

#36) in the Authorised Project using animals for scientific purposes #12ANI01. Monocyte isolation was performed by positive selection of CD14+ cells as previously described (Hope et al., 2003). CD14+ cells were then seeded in 6-well plates, with or without glass coverslips, at 3×10^6 cells/well and cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies, France) supplemented with 2 mM l-glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 50 μ g/mL gentamicin (Life Technologies, France) and 10% heat inactivated foetal calf serum (Eurobio AbCys, France) for 6 days at 37 °C and 5% CO₂. Half of the medium was replaced after 3 days. After 6 days of differentiation, the cells were referred to as monocyte-derived macrophages.

After two washes with phosphate buffered saline (PBS) the cells were infected with washed mycoplasmas at the end of the exponential phase of growth using a multiplicity of infection (MOI) of around 200. Twenty percent v/v of the corresponding *Mmm* or *M. bovis* specific antiserum was added respectively and the cells were incubated for 30 min at 37 °C. The cells were washed twice with PBS before further analysis. The specific antisera used for opsonisation consisted each in pooled sera from ten convalescent animals. The *M. bovis* antisera, originating from France, were a gift from Florence Tardy (ANSES Lyon, France). The *Mmm* antisera were originated from Cameroon (Laboratoire National Vétérinaire, Garoua).

Table 2

Characteristics of selected fluorescent proteins.

Characteristics	mCherry	mKO2	mNeonGreen
Number of amino acids	236	218	236
Quaternary structure	Monomer	Monomer	Monomer
Excitation/Emission maxima (nm)	587/610	551/565	506/517
Brightness ^a	15.8	36.4	92.8
pH sensitivity (pKa) ^b	<4.5	5.5	5.7
GenBank accession no.	AY678264.1	AB370332.1	KC295282.1
Reference	Shaner et al. (2004)	Sakaue-Sawano et al. (2008)	Shaner et al. (2013)

^a Brightness: Extinction Coefficient (mM⁻¹ cm⁻¹) × Fluorescence Quantum Yield.^b pH at which fluorescence intensity is 50% of its maximum value.

2.5. Fluorescence and confocal microscopy

Direct observation of mycoplasma colonies was conducted after 3 days incubation on PPLO agar using an AxioVert A1 inverted microscope equipped with CY3 and EGFP filter units (Carl Zeiss, Germany) for observation of red and green fluorescence respectively. The exposure conditions were set so that no autofluorescence was observed on wild-type cultures. These conditions were identical for all images taken using CY3 filters (0.3 ms at 12 dB) and EGFP filters (0.1 ms at 6 dB) respectively. Images were taken with a 10X objective using a QImaging CDD digital camera and analysed using the Archimed software (Microvision Instruments, France).

For confocal microscopy analysis, three day old mycoplasma broth cultures were pelleted, re-suspended in 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, France) in PBS and fixed during 15 min at room temperature (RT). Mycoplasmas were washed twice in PBS, re-suspended in 20 µL ProLong Diamond Antifade Mountant (Fisher scientific, USA) and transferred to a standard slide for microscopy observation.

Macrophages to be analysed by confocal microscopy were cultured on glass coverslips. Three washes in PBS were performed between each of the following steps: (i) staining using a 1.5X working solution of CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain

(Molecular Probes, Life Technologies, USA) during 10 min at 37 °C; (ii) fixing with 4% PFA in PBS for 20 min at RT; (iii) nuclei staining with 2 µg/mL Hoechst 33258 pentahydrate dye solution (Molecular Probes, Life Technologies, USA) for 15 min at RT. Finally, coverslips were mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant.

Observations were carried out on a ZEISS LSM 700 confocal laser scanning microscope. All images were acquired with a Plan-Apochromat 63X oil objective at a resolution of 620 × 620 pixels for mycoplasma observation and 512 × 512 pixels for macrophage imaging and with a pinhole aperture of 1 airy unit. mNeonGreen was excited with a 488 nm laser and the variable secondary dichroic (VSD) beamsplitter was set so as to recover all the fluorescence emitted up to 530 nm. Two other distinct tracks were created to recover the emission signals of Hoechst (405 nm laser and VSD beamsplitter set at 490 nm on the photomultiplier tube 1, PMT1) and CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain (555 nm laser and VSD beamsplitter set at 630 nm on the PMT1). All images were captured using the same parameters to allow comparisons and were analysed using the ZEN software (Carl Zeiss, Germany).

2.6. Flow cytometry

Mycoplasma broth cultures at the end of the exponential phase of growth were washed twice and carefully re-suspended in PBS before flow cytometry analysis. Data acquisition and analysis were performed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA), with an excitation wavelength of 488 nm and detection with a 530/30-nm band-pass filter. A minimum of 10,000 mycoplasma cells were analysed and their global median fluorescence intensi-

ties (MFI) were calculated for comparison. The FACSDiva 6 software (BD Biosciences, USA) was used for data analysis.

Infected and non infected macrophages were also analysed by flow cytometry. Cell viability was measured using propidium iodide (PI). Cells were washed twice in PBS before re-suspension in PI at 2 µg/mL and the percentage of dead cells marked with PI was measured by flow cytometry. Since mycoplasmas are permeable to PI, this method also allowed discriminating intracellular (PI-negative) and extracellular (PI-stained) mycoplasmas. Data acquisition and analysis were performed as described above for green fluorescence, and a 585/42-nm band-pass filter was used for red fluorescence. A minimum of 20,000 cells within a gated region excluding cell debris were analysed.

3. Results

3.1. Construction of fluorescence expression tools for whole mycoplasma cell labelling

New genetic tools for constitutive, high level expression of fluorescent proteins in mycoplasmas were developed as summarised in Fig. 1. The mini-transposon pMT85/2res (Fig. 1C) was used for gene delivery. pMT85/2res is a genetic tool for stable, random mutagenesis that allows the elimination of the antibiotic resistance marker from selected mycoplasma mutants by treatment with a resolvase enzyme (Janis et al., 2008). This vector was modified to allow the expression of cloned genes in mycoplasmas under the control of the strong promoter of the elongation factor Tu gene of *Mmm* (*tufA*). The rho-independent transcription terminator of the fibril protein gene of the phytopathogenic mycoplasma *S. citri* (*fib*) was also included to avoid undesirable read-through of stop codons (Duret et al., 2005). The expression unit was inserted in the *SpeI* site of pMT85/2res, which allows its preservation in the event of resolvase treatment. The resulting plasmid was named pMT/exp (Fig. 1B).

The red fluorescent proteins mCherry and mKO2 and green fluorescent protein mNeonGreen were selected for expression in mycoplasmas owing to their interesting properties (Table 2). Their gene sequences were optimised taking into consideration the codon usage bias in mycoplasmas (Suppl. Table 1). All optimised sequences had a GC content exceeding 29%. Synthetic constructs corresponding to mycoplasma-optimised gene sequences of each of the three fluorescent proteins were cloned in pMT/exp, resulting in plasmids pMT/mCherry, pMT/mKO2, and pMT/mNeonGreen (Fig. 1A).

3.2. Expression of bright red and green fluorescent proteins in two distant mycoplasma species

The performance of fluorescence expression tools pMT/mCherry, pMT/mKO2, and pMT/mNeonGreen in the distant species *Mmm* and *M. bovis* was assessed in order to demonstrate their broad spectrum for use in mycoplasmas. Both strains were successfully transformed with the three vectors and the

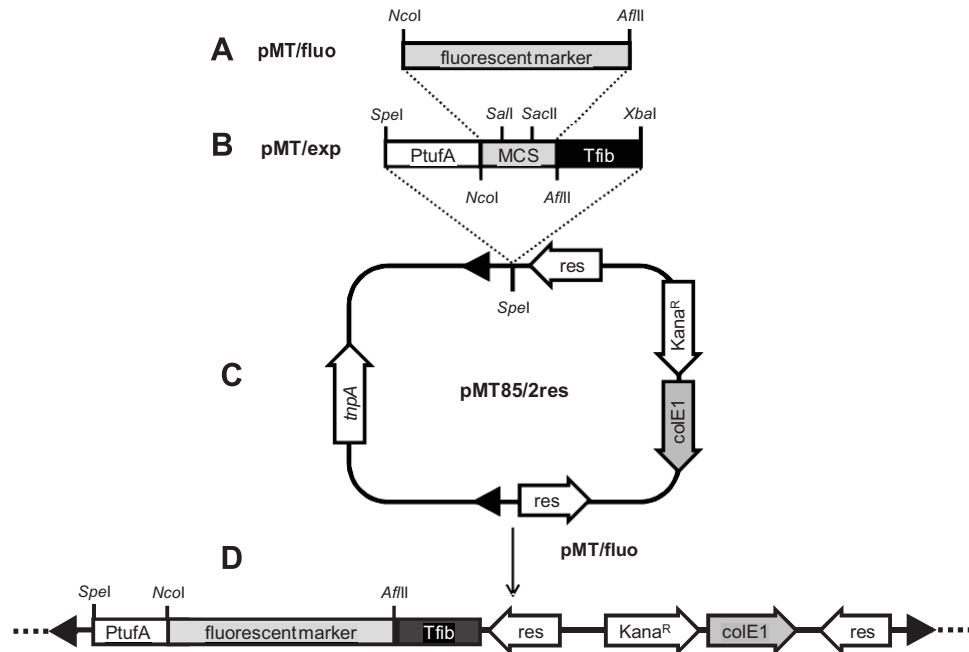


Fig. 1. Modification of the mini-transposon pMT85/2res for expression of fluorescent proteins in mycoplasmas. A: Cloning of mycoplasma-optimised gene sequences of fluorescent proteins mNeonGreen, mCherry and mKO2 (fluorescent marker) in pMT/exp (B), resulting in plasmids pMT/mNeonGreen, pMT/mCherry and pMT/mKO2 respectively (pMT/fluor). B: Cloning of a cassette comprising the *tufA* promoter of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (PtufA), a multiple cloning site (MCS), and the *fib* transcription terminator of *Spiroplasma citri* (Tfib) in pMT85/2res (C), resulting in vector pMT85/exp. C: pMT85/2res plasmid map, displaying the transposase gene (*tnpA*), the *colE1* origin of replication, and the *aacA-aphD* gene (Kana^R). This selection marker is located between the two inverted repeats (IR, black arrowheads) that define the extremities of the transposed fragment (D), whereas the transposase is located outside, for increased mutant stability. The *res* sequences are the targets of the $\mu 6$ resolvase, which induces the excision of the entire sequence comprised between them. D: Schematic representation of a pMT/exp transposition event. The two IR (black arrowheads) define the extremities of the transposon insertion in the mycoplasma genome (discontinuous line). The transposed fragment contains the fluorescence expression system (PtufA-fluorescent marker-Tfib), as well as the Kana^R gene and *colE1* origin, flanked by the two *res* sequences.

transformation efficiencies ranged between 10^{-5} and 10^{-6} transformant cfu/total cfu regardless the strain and construct used. Each transformation tube yielded from several hundreds to over one thousand transformant clones.

Five to seven days after transformation fluorescent colonies were directly observed on selective plates by fluorescence microscopy for all mycoplasma strains and constructs used. Furthermore, all the colonies corresponding to the same construct presented equivalent levels of fluorescence, only depending on the size and density of the colonies. Fluorescent clones were selected from the fastest growing mutants. However, the site of the transposon insertion should also be considered in order to limit the effect of gene disruption in subsequent functional studies. As a mode of example, the transposon insertion site of *Mmm* mutants was sequenced and those presenting insertions in intergenic sequences or irrelevant sites such as pseudogenes were chosen (Suppl. Table 2). Since strains may be attenuated through consecutive *in vitro* passages and this may also interfere with functional studies, the number of subcultures was kept to a minimum. The whole process from wild-type strain seeding for transformation until selection of fluorescent clones required five passages and two cloning procedures.

The brightness of selected *M. bovis* clones expressing each of the three fluorescent proteins was assessed by fluorescence microscopy (Fig. 2). Examination of all solid cultures using CY3 filters under the same exposure conditions resulted in observation of red fluorescent colonies on plates corresponding to mCherry and mKO2-expressing mycoplasmas, whereas no fluorescence was detected in wild-type and mNeonGreen-expressing cultures. On the other hand, identical exposure conditions using EGFP filters resulted in observation of bright green fluorescent colonies only in mNeonGreen-expressing cultures. The intensity of red fluorescence

was higher in mKO2 than in mCherry-expressing mycoplasmas, as expected according to the reported brightness of the respective fluorescent proteins (Table 2). The intensity of green fluorescent colonies was also remarkable, considering the higher level of auto-fluorescence evidenced on mycoplasma cultures directly observed using EGFP filters, which imposed lower exposure conditions. Similar results were obtained by observation of three-day-old plate cultures from selected *Mmm* clones expressing each of the three fluorescent proteins, with apparently lower fluorescence intensities attributed to the small size of *Mmm* colonies, compared to those of *M. bovis* (Suppl. Fig. 2). However, no difference in colony size was evidenced between any of the transformant clones and the corresponding wild-type strain. Furthermore, fluorescence expression was conserved after more than 10 *in vitro* passages in the absence of selective pressure.

Broth cultures of fluorescent mycoplasma clones were then analysed by confocal microscopy in order to visualize individual mycoplasma cells. An example is presented in Suppl. Fig. 3. Individual mycoplasmas expressing mNeonGreen could also be detected by flow cytometry (Suppl. Fig. 4). Flow cytometry was therefore used to quantify the relative green fluorescence intensity of mNeonGreen-expressing and wild-type mycoplasmas at the end of the exponential phase of growth in order to confirm that the expression system developed here could induce comparable fluorescence levels in *M. bovis* and *Mmm* (Table 3). The MFI values registered in *M. bovis* strains were higher than those recorded in *Mmm*, indicating that the green fluorescence background was higher in this species. However, the MFI ratio between mNeonGreen-expressing and wild-type clones was equivalent in both species (corresponding to a 10–17-fold increase in MFI values, as recorded in three independent experiments).

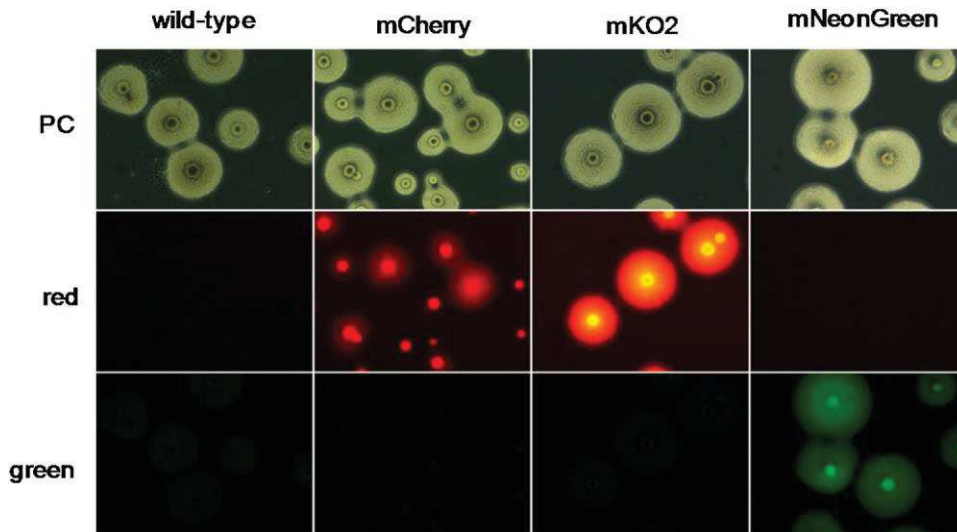


Fig. 2. Micrographs of three-day-old *Mycoplasma bovis* colonies on solid medium observed under a fluorescence microscope. From left to right: *M. bovis* wild-type and mCherry, mKO2 and mNeonGreen-expressing strains. From top to bottom: imaging using phase contrast (PC) and epifluorescence with CY3 filters (red) and EGFP filters (green). The mycoplasma colonies present a typical “fried-egg” appearance, with a dense centre embedded in the agar showing more intense fluorescence signals. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3

Fold-change increase in green fluorescence intensity associated to mNeonGreen expression in the species *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* and *Mycoplasma bovis*.

Experiment	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>			<i>M. bovis</i>		
	WT ^a	Neon ^a	FC ^b	WT ^a	Neon ^a	FC ^b
1	89	1015	11.4	225	3769	16.8
2	72	1140	15.8	693	7222	10.4
3	65	929	14.3	578	7240	12.5

^a Median fluorescence intensity values.

^b Fold-change increase in median fluorescence intensity in the mNeonGreen-expressing strain (Neon) compared to the wild-type strain (WT).

3.3. Detection of fluorescent mycoplasmas inside host cells by flow cytometry and confocal microscopy

A macrophage infection assay was used to assess if the brightness of fluorescently-labelled mycoplasmas was sufficient to allow their direct detection inside host cells. The mNeonGreen-expressing mycoplasma clones were selected for these assays owing to practical reasons, since they were suited for flow cytometry analysis.

Bovine macrophages were infected with specifically-opsonised *M. bovis* strains at an MOI of around 200 and the cells were analysed by flow cytometry 30 min post-inoculation (Fig. 3). The forward versus side-scatter plot analyses allowed the definition of a gate excluding cell debris and aggregates. *M. bovis*-infected macrophages presented higher levels of debris than uninfected cells, suggesting an increase in mortality due to *M. bovis* infection, independently of the clone used. The macrophages infected with wild-type *M. bovis* presented a higher green fluorescence background than the uninfected cells (representing approximately a 4-fold increase in MFI). However, the cells infected with mNeonGreen-expressing *M. bovis* were significantly more fluorescent than those infected with the wild-type strain (10-fold increase in MFI). Moreover, these two populations were clearly discriminated according to green fluorescence, since 96% of the cells infected with the mNeonGreen-expressing strain (versus 2% of those infected with the wild-type strain) fluoresced above background levels (Fig. 3). Finally, to confirm that the detected fluorescence resulted from intracellular bacteria, and not from

mycoplasmas attached to the cell surface, a PI protection assay was performed. The percentage of PI-positive cells among the mNeonGreen-positive cells never exceeded 2% (results not shown). This implied that the great majority of the mycoplasmas, which are permeable to PI, were protected from staining, indicating that they were located inside the cells. The same experiment performed using Mmm wild-type and green fluorescent strains provided very similar results (Suppl. Fig5)

The intracellular location of fluorescent mycoplasmas was further demonstrated by confocal microscopy analysis. Fig. 4 shows confocal micrographs of macrophages infected with *M. bovis* 30 min post-inoculation. Many green fluorescent *M. bovis* were observed inside the macrophages infected with the mNeonGreen-expressing strain (Fig. 4C), both in tight clusters and as individual particles dispersed in the cytoplasm. The size of the particles was estimated at nearly 0.5 µm, which corresponds to the size of a mycoplasma cell (Citti and Blanchard, 2013), and most of them were observed in the middle focal plane with the cell nucleus, demonstrating that they were located inside the macrophage. No green fluorescence was observed either in uninfected macrophages or in macrophages infected with wild-type mycoplasmas (Fig. 4A and B respectively) and no morphological or functional differences were detected in macrophages infected with the mNeonGreen-expressing *M. bovis* compared to those infected with the wild-type strain (Fig. 4C and B respectively). Very similar results were obtained by infection of macrophages with Mmm strains (Suppl. Fig. 6), confirming that individual mNeonGreen-expressing mycoplasmas could be directly detected inside phagocytic cells.

4. Discussion and conclusions

4.1. Development of fluorescence expression tools for whole mycoplasma cell labelling

The aim of this work was to develop universal fluorescence expression tools for whole mycoplasma cell labelling to monitor the dynamics of mycoplasma infections. The first objective was therefore to select the appropriate vector, expression system and fluorescent proteins allowing the production of stable and innocuous bright fluorescent tags to label mycoplasma cells from different species.

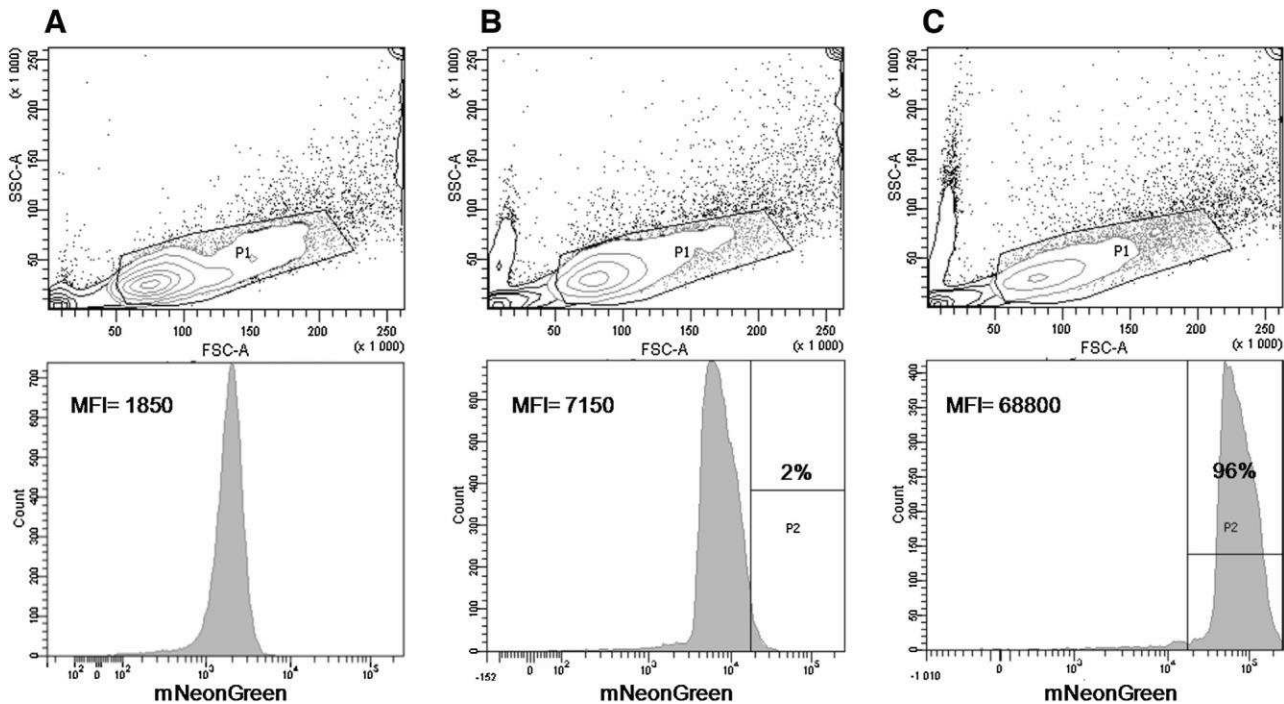


Fig. 3. Flow cytometry analysis of bovine macrophages infected with specifically-opsonised *Mycoplasma bovis* strains at a multiplicity of infection of around 200 during 30 min. A: uninfected cells; B: cells infected with wild-type *M. bovis*; C: cells infected with mNeonGreen-expressing *M. bovis*. Forward versus side scatter (FSC and SSC, respectively) contour plots show the gated region (P1). Histogram plots display the median fluorescence intensity (MFI) and the percentage of positive cells (P2 interval) for each condition. P2 was set based on macrophages infected with wild-type *M. bovis* to exclude background due to autofluorescence. A representative result from two experiments is shown.

The mini-transposon pMT85/2res, a genetic tool for stable, random mutagenesis allowing the production of unmarked mutations (Janis et al., 2008; Zimmerman and Herrmann, 2005), was selected as vector for gene delivery in mycoplasmas. pMT85/2res was derived from the transposon Tn4001 of *S. aureus*, which presents a broad host spectrum and has been successfully used in a variety of mycoplasma species (Halbedel and Stülke, 2007). This vector proved to be very practical and convenient. Transformation of *Mmm* and *M. bovis* strains with pMT85/2res-based constructs allowed the direct isolation of transformant colonies on agar, limiting the number of *in vitro* passages required for clone selection. Clones could then be stably propagated in non-selective medium, which may be critical for certain functional studies. Although the use of a transposon delivery vector rather than a replicating plasmid for gene delivery implied the integration in the mycoplasma chromosome and the subsequent risk of functional alterations, the transformation efficiency was sufficient to allow the selection of large numbers of mutants for which the insertion site could easily be characterised. Furthermore, transposon mutagenesis may actually be extremely useful for the construction of mutant libraries of fluorescently labelled mycoplasmas.

pMT85/2res was modified to express heterologous genes in mycoplasmas, resulting in the expression vector pMT/exp. The strong promoter of the elongation factor Tu gene of *Mmm* (*tufA*) was used to drive the expression of cloned genes in this system. The expression units of constitutively, highly expressed genes are the candidates of choice to maximise gene expression and the *tuf* promoter has already been used to drive the expression of heterologous genes in several mycoplasma species (Renaudin et al., 2015; Tulum et al., 2014; Zimmerman and Herrmann, 2005), including *M. bovis* (Sharma et al., 2014) and *M. mycoides* (Karas et al., 2014). However, in this study the *tufA* promoter of *Mmm* was successfully used for gene expression in the heterologous species *M. bovis*. The equivalent expression of high levels of fluorescence in *Mmm*

and *M. bovis*, two mycoplasma species belonging to distant phylogenetic groups (Sirand-Pugnet et al., 2007), indicated that the expression system may be broadly applied in mycoplasmas. This was not without precedent, since the promoter of the spiralin gene, the most abundant protein of *S. citri*, proved to be efficient in driving gene expression in a variety of mycoplasma species (Renaudin et al., 2014).

The efficiency of the expression system in distant mycoplasma species, added to the broad host range of Tn4001 transposition makes pMT/exp a versatile tool for gene expression in mycoplasmas. One limitation to the use of Tn4001-derivative mini-transposons is that the *aacA-aphD* gene is not functional in certain mycoplasma species including *M. penetrans* and *M. fermentans*, which are naturally resistant to kanamycin, and *M. genitalium*, where the expression of the *aacA-aphD* gene results in growth impairment. Also in *M. arthritidis* and *M. pulmonis* Tn4001 insertion was not possible, presumably due to functional failure of the *aacA-aphD* gene (Renaudin et al., 2014). However, this limitation may easily be solved by using either the chloramphenicol acetyltransferase gene (*cat*) or the tetracycline resistance marker (*tetM*), which have been shown to function in these species (Renaudin et al., 2014), for the selection of transposon mutants.

pMT/exp was used to express fluorescent proteins in *Mmm* and *M. bovis*. Since the expression of fluorescent markers in mycoplasmas remains rare and has met with difficulties (Duret et al., 2003), several unrelated proteins were used to increase the chances of success. The green fluorescent protein mNeonGreen (Shaner et al., 2013) and red fluorescent proteins mCherry (Shaner et al., 2004) and mKO2 (Sakaue-Sawano et al., 2008) were selected owing to their interesting properties (Table 2). They are all monomeric proteins, which are generally nontoxic (Shaner et al., 2005), and are characterised by high intrinsic brightness, particularly mKO2 and mNeonGreen. On the other hand, mCherry is particularly resistant

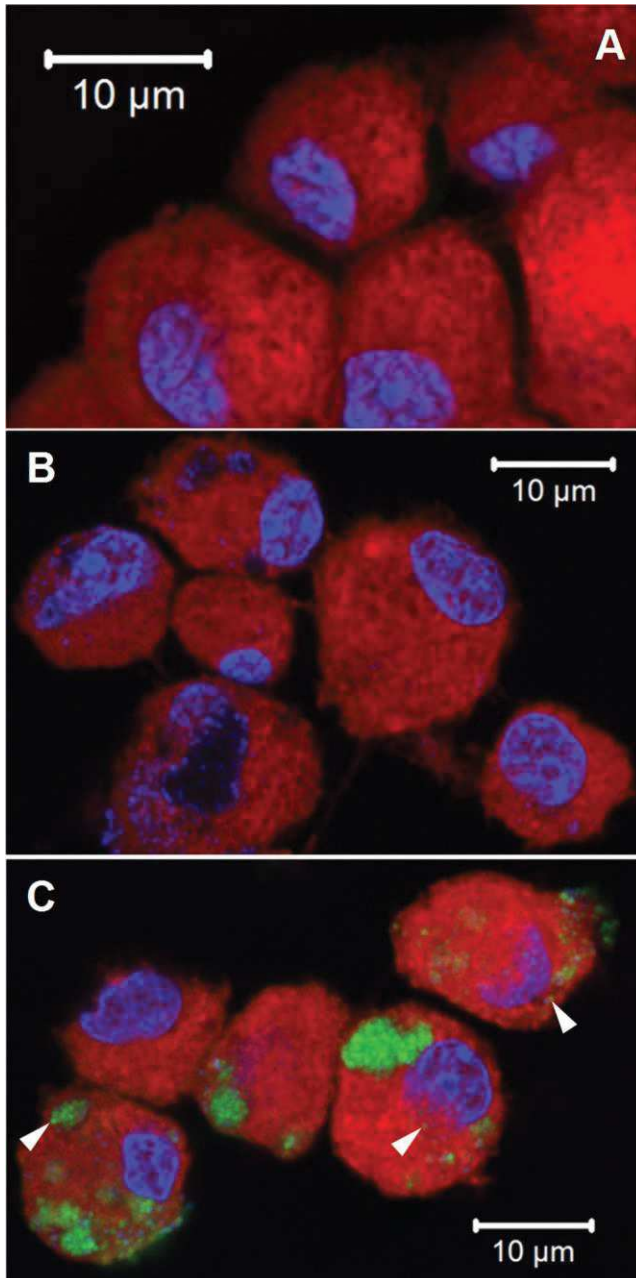


Fig. 4. Confocal micrographs of bovine macrophages infected with *Mycoplasma bovis* as in Fig. 3. A: uninfected macrophages; B: macrophages infected with wild-type *M. bovis*; C: macrophages infected with mNeonGreen-expressing *M. bovis*. They present the overlay of three fields showing in red the macrophage's membrane and cytosol, in blue the cell nucleus and mycoplasma DNA, and in green the mNeonGreen-expressing *M. bovis*. The white arrowheads indicate fluorescently labelled mycoplasma cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to low pH, which may be useful for observation of mycoplasmas inside acidic compartments such as lysosomes.

All three fluorescent proteins were successfully expressed in both species, to such extent that bright fluorescent colonies could be directly observed on conventional culture medium by fluorescence microscopy. Furthermore, no signs of toxicity could be attributed to any of them. No growth impairment or other phenotypic changes were observed on fluorescent mutant strains, indicating that they were neither affected by the transposon insertion, nor by the production of high levels of fluorescent proteins, and the strains remained fluorescent after more than 10 *in vitro*

passages in the absence of selective pressure. This was an important achievement, since attempts to express fluorescent proteins in mycoplasmas were not always successful. Expression of the green fluorescent protein (GFP) in fusion with spiralin, the major surface lipoprotein of *S. citri*, resulted in morphologic changes in cells and in reduced colony size (Duret et al., 2003). Moreover, the mutants were unstable and resulted in the production of subclones that did not express GFP, leading the authors to hypothesise that the fluorescent protein was toxic for this species. There are only a few studies reporting the expression of GFP derivatives, which were used as fusion tags to localise mycoplasma components in *M. pneumoniae* (Balish et al., 2003; Kenri et al., 2004) and *M. mobile* (Tulum et al., 2014). Also in *M. pneumoniae*, the monomeric red fluorescent protein (mRFP1) was used as fluorescent reporter system (Zimmerman and Herrmann, 2005). However, until now, there have been no reports of fluorescence expression tools for whole mycoplasma cell labelling allowing the direct observation of fluorescent colonies on agar and providing sufficient fluorescence levels for use in host-mycoplasma interaction studies. Since the strategy used here for fluorescent protein expression was very similar to that previously used for GFP derivatives and mRFP1 (with the exception that the mRFP1 gene sequence was not codon-optimised) the present success must be mainly attributed to the choice of fluorescent proteins.

4.2. Use of mycoplasma fluorescence expression systems for host-pathogen interaction studies

Fluorescence expression systems for whole mycoplasma cell labelling were developed in this study as tools for monitoring the dynamics of mycoplasma infections. Although pathogenic mycoplasmas can be indirectly detected using fluorescent antibody labelling, traditional immunofluorescence detection techniques are time-consuming, tedious and expensive. Alternatively, they can be directly coated with fluorochromes, but the fluorescence signal may fade over time and is diluted during replication. Consequently, these approaches are of limited value for tracing invasion pathways in living cells (Ling et al., 2000). Undeniably, the use of chromosomally tagged mycoplasmas would facilitate the analysis of the mechanisms involved in colonisation and persistence by allowing the direct monitoring of mycoplasma adhesion, invasion, survival and multiplication inside host cells. Therefore, the next objective of this study was to demonstrate that the brightness of fluorescently-labelled mycoplasmas was sufficient to allow their direct detection inside host cells. The mNeonGreen-expressing mycoplasmas were selected for this “proof of concept”, since they could be analysed by flow cytometry, and a macrophage infection assay was used in order to warrant the intracellular location of mycoplasmas. The presence of fluorescent mycoplasmas inside live phagocytic cells was detected and quantified by flow cytometry and corroborated by confocal microscopy imaging, which allowed the direct observation of individual mycoplasmas in the cytoplasm of infected cells. Furthermore, no signs of cytotoxicity could be identified and the use of fluorescently labelled mycoplasmas did not interfere with the cell infection assay. These results indicated that the fluorescence expression systems for whole mycoplasma cell labelling were well suited for the analysis of host-pathogen interactions. These new tools offer very interesting perspectives for mycoplasma research by allowing the direct monitoring of mycoplasma infections both *in vitro* and *in vivo*.

Cell invasion can be a major contributor to the establishment of persistent infections and chronic disease by mycoplasmas (Browning et al., 2014), but this phenomenon has only been studied in a few mycoplasma species and the mechanisms involved remain totally unknown. So far, evidence of the intracellular localisation of mycoplasmas has required a combination of microscopic observa-

tions with immunochemistry, differential staining or fluorescence labelling techniques, often substantiated by *in vitro* invasion assays such as the “gentamicin survival assay” (Citti et al., 2005). The use of chromosomally tagged mycoplasmas offers interesting advantages, since they can be directly visualized with no dilution of the fluorescence signal by confocal microscopy, allowing the accurate analysis of mycoplasma invasion pathways. Furthermore, time-lapse imaging may be performed for monitoring cell infections in real-time (O’Neill et al., 2016). Flow cytometry has also been very useful for evaluating mycoplasma attachment to eukaryotic cells, which is considered a pre-requisite for colonisation and invasion. *In vitro* adherence assays based on flow cytometry have been used in a variety of mycoplasma models offering diverse applications (as a mode of example, Aye et al., 2015; García-Morales et al., 2014; Leigh and Wise, 2002; Schurwanz et al., 2009). However, these assays used either fluorescent antibodies or fluorochromes for mycoplasma labelling. The use of chromosomally tagged mycoplasma strains can provide a quick, quantitative and objective method to compare adherence to and invasion of different host cells, and offers the possibility of evaluating intracellular survival and replication. Furthermore, this method may be extremely useful for high throughput screening of cell adherence and invasion among different mycoplasma strains or mutants. Indeed, fluorescent mutant libraries, which can be easily generated by random mutagenesis using the fluorescence expression tools presented here, may be directly screened by flow cytometry to identify deficient mutants.

Although *in vitro* cell infection models can provide invaluable information on the mechanisms of mycoplasma pathogenicity, the study of the invasion pathways in the natural host remains essential for a full understanding of the pathogenesis of mycoplasma infections. The tools developed in this study are perfectly suited for the analysis of *in vivo* infections, since fluorescence expression by mycoplasmas is stably maintained in the absence of selective pressure and the antibiotic marker can be eliminated by resolvase treatment. Moreover, chromosomally tagged mycoplasmas may be directly monitored in host tissues, allowing infection kinetics studies both *ex vivo*, by histological examination, and *in vivo*, by direct imaging of small animal hosts or models, as reported in other bacteria (Ling et al., 2000; Zelmer et al., 2012). Finally, the availability of multiple fluorescent markers may be exploited to label different mycoplasma species or strains in order to analyse multiple infections, as previously reported (Ling et al., 2000).

In conclusion, new genetic tools have been developed for the stable introduction of green and red fluorescent proteins as chromosomal tags in mycoplasmas. The process of production, selection and characterisation of fluorescent clones was straightforward and resulted in the unprecedented observation of red and green fluorescent mycoplasma colonies on standard culture medium, whereas no signs of cytotoxicity could be identified. The green fluorescent mycoplasmas could be directly detected inside host cells by flow cytometry and confocal microscopy, thus demonstrating their usefulness for host-mycoplasma interaction studies. Furthermore, these new tools for stable, whole mycoplasma cell labelling offer innumerable perspectives for the functional analysis of mycoplasmas both *in vitro* and *in vivo*.

Authors’ contributions

TB, LMS, VR and FT conceived and designed the study. TB and LMS carried out the experiments and the analysis and drafted the manuscript. MSV carried out the confocal microscopy imaging and participated in drafting the manuscript. PT and VR contributed to the flow cytometry analyses, CP participated in cell culture experiments and CR contributed to cell fixation and mounting protocols. All the authors read, corrected and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to Makoto Miyata and Isil Tulum (Osaka City University, Japan) for their advice regarding the construction of fluorescence expression tools and to Julien Cau (IGH-CNRS, Montpellier, France) for his excellent advice regarding the choice of fluorescent protein markers, for preliminary analysis by confocal microscopy and for constructive discussions. We wish to thank Axel Verdier for the development of the automatic codon optimizer, Florence Tardy (Anses, Lyon, France) for supply of *M. bovis* convalescent sera, Pascal Sirand-Pugnet (INRA, Bordeaux, France) for plasmids pMT85/2res and pPS3.1, and Victoria Chalker (Public Health England, London, UK) for revision of the English language.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.006>.

References

- Aye, R., Mwirigi, M.K., Frey, J., Pilo, P., Jores, J., Naessens, J., 2015. Cyto-adherence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* to bovine lung epithelial cells. BMC Vet. Res. 11, 27. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0347-3>.
- Balish, M.F., Santurri, R.T., Ricci, A.M., Lee, K.K., Krause, D.C., 2003. Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. Mol. Microbiol. 47, 49–60.
- Browning, G.F., Noormohammadi, A.H., Markham, P.F., 2014. Identification and characterization of virulence genes in mycoplasmas. In: Browning, G.F., Citti, C. (Eds.), *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 77–90.
- Citti, C., Blanchard, A., 2013. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. Trends Microbiol. 21, 196–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>, S0966-842X(13)00014-0.
- Citti, C., Browning, G.F., Rosengarten, R., 2005. Phenotypic diversity and cell invasion in host subversion by pathogenic mycoplasmas. In: Blanchard, A., Browning, G.F. (Eds.), *Mycoplasmas: Molecular Pathogenicity Biology Strategies for Control*. Horizon bioscience, Norfolk, UK, pp. 439–483.
- Duret, S., Berho, N., Danet, J.-L., Garnier, M., Renaudin, J., 2003. Spiraline is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematocaps*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6225–6234. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.10.6225-6234.2003>.
- Duret, S., André, A., Renaudin, J., 2005. Specific gene targeting in *Spiroplasma citri*: improved vectors and production of unmarked mutations using site-specific recombination. Microbiol. Read. Engl. 151, 2793–2803. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28123-0>.
- García-Morales, L., González-González, L., Costa, M., Querol, E., Piñol, J., 2014. Quantitative assessment of *Mycoplasma* hemadsorption activity by flow cytometry. PLoS One 9, e87500. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087500>.
- Halbedel, S., Stülke, J., 2007. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. Int. J. Med. Microbiol. 297, 37–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.11.001>.
- Hope, J.C., Whelan, A.O., Hewinson, R.G., Vordermeier, M., Howard, C.J., 2003. Maturation of bovine dendritic cells by lipopeptides. Vet. Immunol. Immunopathol. 95, 21–31 (S0165242703001041).
- Hutchison, C.A., Chuang, R.-Y., Noskov, V.N., Assad-Garcia, N., Deerincq, T.J., Ellisman, M.H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B.J., Ma, L., Pelletier, J.F., Qi, Z.-Q., Richter, R.A., Strychalski, E.A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K.S., Smith, H.O., Glass, J.L., Merryman, C., Gibson, D.G., Venter, J.C., 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. Science 351, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad6253>, aad6253.
- Janis, C., Bischof, D., Gourgues, G., Frey, J., Blanchard, A., Sirand-Pugnet, P., 2008. Unmarked insertional mutagenesis in the bovine pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: characterization of a lppQ mutant. Microbiol. Read. Engl. 154, 2427–2436. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/017640-0>.
- Karas, B.J., Wise, K.S., Sun, L., Venter, J.C., Glass, J.L., Hutchison, C.A., Smith, H.O., Suzuki, Y., 2014. Rescue of mutant fitness defects using *in vitro* reconstituted designer transposons in *Mycoplasma mycoides*. Front. Microbiol. 5, 369. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00369>.
- Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., Miyata, M., 2004. Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. J. Bacteriol. 186, 6944–6955. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.20.6944-6955.2004>.
- Leigh, S.A., Wise, K.S., 2002. Identification and functional mapping of the *Mycoplasma fermentans* P29 adhesin. Infect. Immun. 70, 4925–4935.

- Ling, S.H., Wang, X.H., Xie, L., Lim, T.M., Leung, K.Y., 2000. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology* 146 (Pt 1), 7–19.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., Ikemura, T., 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 28, 292.
- O'Neill, A.M., Thurston, T.L., Holden, D.W., 2016. Cytosolic replication of group A *Streptococcus* in human macrophages. *MBio* 7.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094–1156.
- Renaudin, J., Breton, M., Citti, C., 2014. Molecular genetic tools for Mollicutes. In: Browning, G.F., Citti, C. (Eds.), *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 55–76.
- Renaudin, J., Béven, L., Batailler, B., Duret, S., Desqué, D., Arricau-Bouvery, N., Malembic-Maher, S., Foissac, X., 2015. Heterologous expression and processing of the flavescence dorée phytoplasma variable membrane protein VmpA in *Spiroplasma citri*. *BMC Microbiol.* 15, 82, [10.1186/s12866-015-0417-5](http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0417-5).
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., Miyawaki, A., 2008. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132, 487–498.
- Schurwanz, N., Jacobs, E., Dumke, R., 2009. Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of *Mycoplasma pneumoniae* for vaccine development. *Infect. Immun.* 77, 5007–5015, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00268-09>.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1037>.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2, 905–909.
- Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chamma, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W., Wang, J., 2013. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat. Methods* 10, 407–409, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2413>.
- Sharma, S., Markham, P.F., Browning, G.F., 2014. Genes found essential in other mycoplasmas are dispensable in *Mycoplasma bovis*. *PLoS One* 9, e97100, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097100>.
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., Blanchard, A., 2007. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res. Microbiol.* 158, 754–766, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.007>.
- Tulum, I., Yabe, M., Uenoyama, A., Miyata, M., 2014. Localization of P42 and F(1)-ATPase α -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. *J. Bacteriol.* 196, 1815–1824, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01418-13>.
- Zelmer, A., Carroll, P., Andreu, N., Hagens, K., Mahlo, J., Redinger, N., Robertson, B.D., Wiles, S., Ward, T.H., Parish, T., Ripoll, J., Bancroft, G.J., Schaible, U.E., 2012. A new *in vivo* model to test anti-tuberculosis drugs using fluorescence imaging. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1948–1960, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks161>.
- Zimmerman, C.-U., Herrmann, R., 2005. Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 315–321, <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.054>.

Figures supplémentaires de l'article :

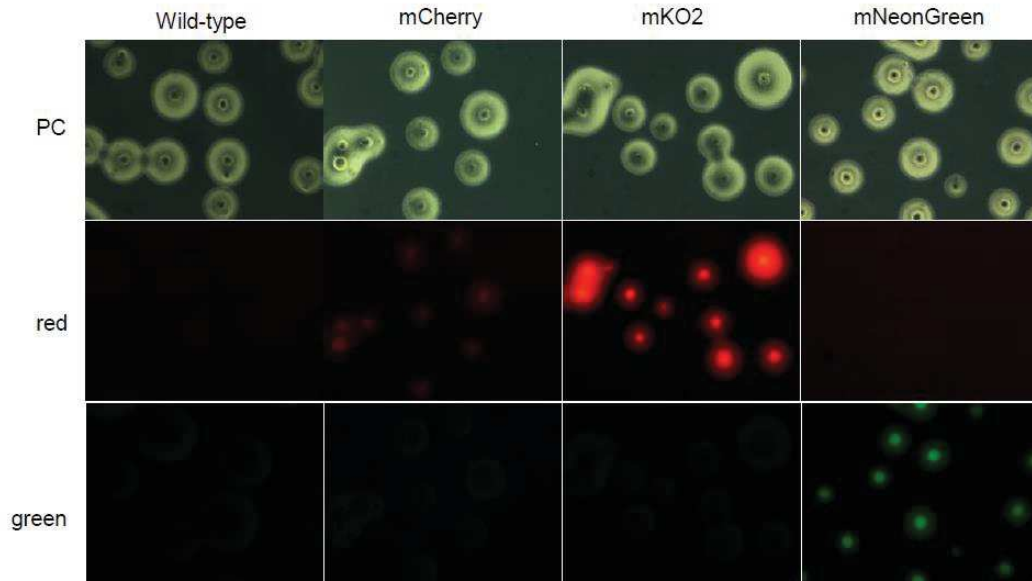
Supplementary Table 1: Codon optimisation table

Amino acid	Assigned codon
F	TTT
L	TTA
I	ATT
M	ATG
V	GTT
S	TCA
P	CCA
T	ACT
A	GCT
Y	TAT
H	CAT
Q	CAA
N	AAT
K	AAA
D	GAT
E	GAA
C	TGT
W	TGA
R	AGA
G	GGA

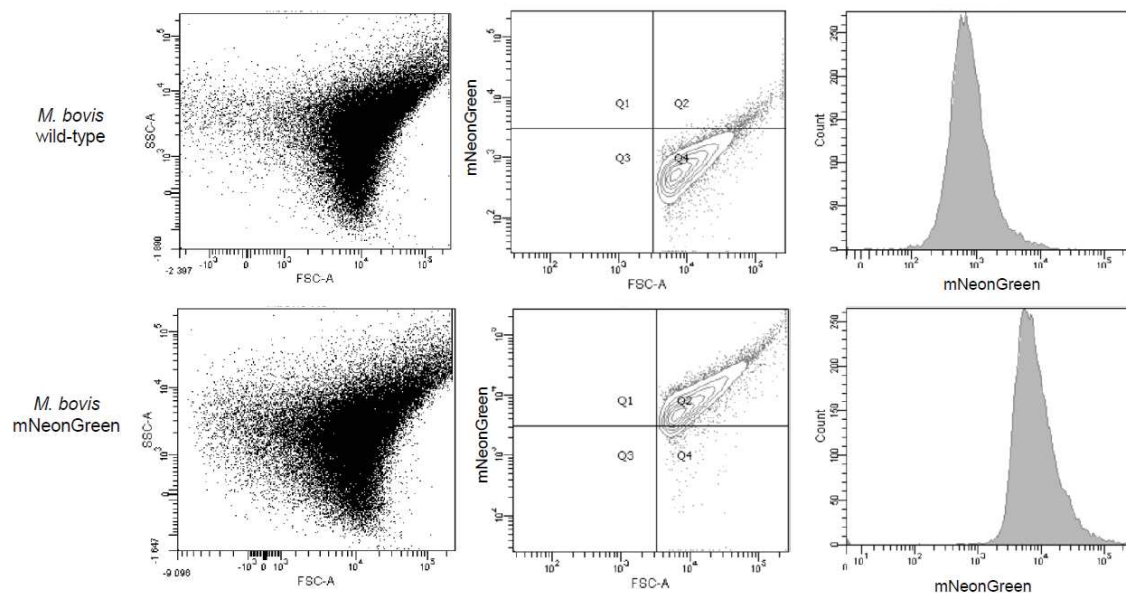
Supplementary Table 2: Transposon insertion sites of selected *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* fluorescent clones.

Strain ¹	Insertion site according to the genome of strain PG1 ^T (BX293980.2)
mCherry	Intergenic region, 98bp after the preceding CDS (MSC_0650, "Hypothetical protein") and 302bp before the next (MSC_0651, "Hypothetical protein")
mKO2	MSC_0248 "N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase" gene flanked by insertion sequences
mNeonGreen	MSC_0109; MSC_0974; MSC_0982; MSC_0988: glycosyltransferase (<i>cps</i>) present in four copies (some degenerated)

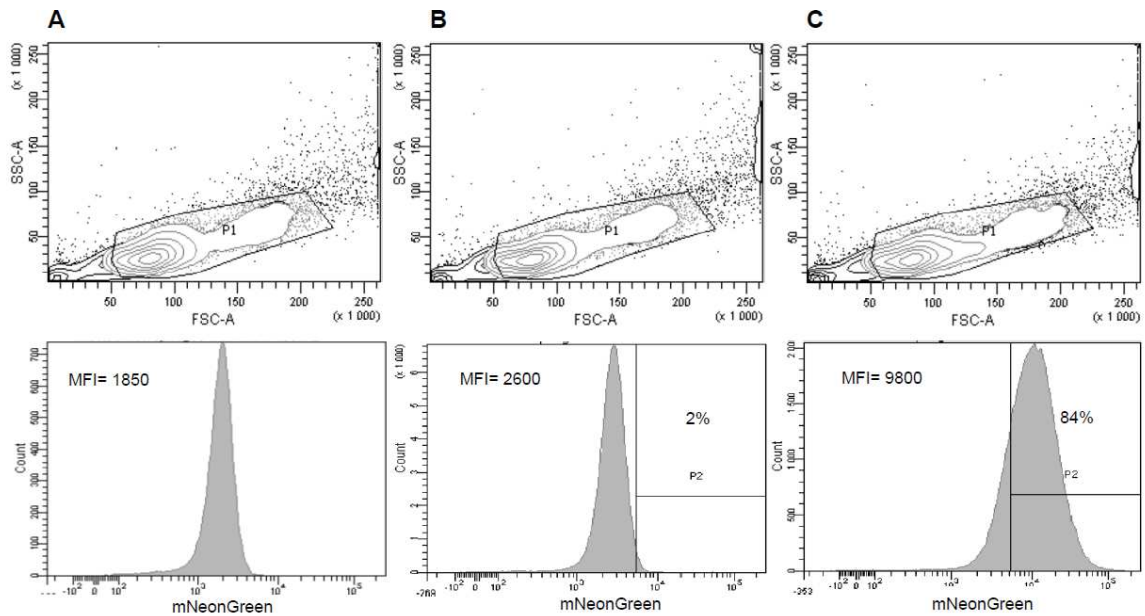
¹Selected clone expressing the corresponding fluorescent marker



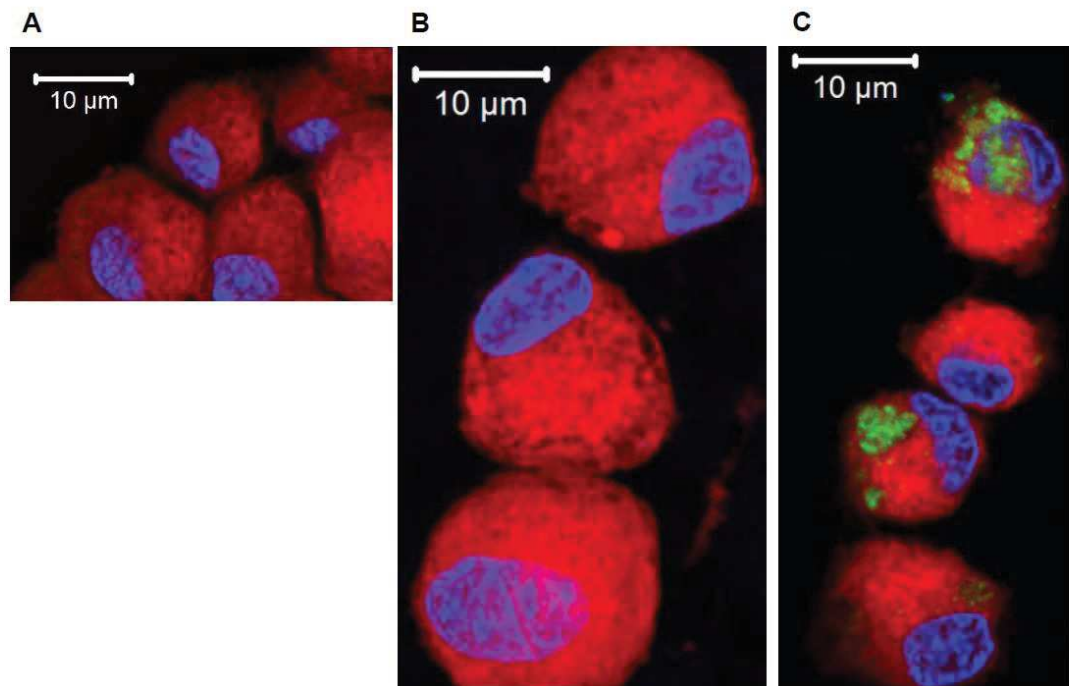
Supplementary Figure 2: Micrographs of three-day-old *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* colonies cultured on Hayflick's solid medium and directly observed under a fluorescence microscope. From left to right: colonies of wild-type strain and mCherry, mKO2 and mNeonGreen-expressing strains. From top to bottom: imaging using phase contrast (PC) and epifluorescence with CY3 filters (red) and EGFP filters (green). The mycoplasma colonies present a typical "fried-egg" appearance, with a dense centre embedded in the agar showing more intense fluorescence signals.



Supplementary Figure 4: Wild-type and mNeonGreen-expressing *Mycoplasma bovis* analysed by flow cytometry. The left column displays forward versus side scatter (FSC and SSC, respectively) dot plots in log scale. Both cell populations are homogeneous. The central column corresponds to FSC v mNeonGreen contour plots, showing a good discrimination between wild-type (in the Q4 quadrant) and fluorescent mycoplasmas (in the Q2 quadrant). The histograms on the right column display the distribution of green fluorescence among the entire mycoplasma populations. The mNeonGreen-expressing strain shows higher fluorescence intensity than wild-type strain (roughly corresponding to a 10-fold increase in median fluorescence intensity).



Supplementary Figure 5: Flow cytometry analysis of bovine macrophages infected with specifically-opsonised *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strains at a multiplicity of infection of around 200 during 30 min. **A:** uninfected macrophages; **B:** macrophages infected with the wild-type strain; **C:** macrophages infected with the mNeonGreen-expressing strain. Forward versus side scatter (FSC and SSC, respectively) contour plots show the gated region (P1). Histogram plots display the median fluorescence intensity (MFI) and the percentage of positive cells (P2 interval) for each condition. P2 was set based on macrophages infected with the wild-type strain to exclude background due to autofluorescence. A representative result from two experiments is shown.



Supplementary Figure 6: Confocal micrographs of bovine macrophages infected with specifically-opsonised *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strains at a multiplicity of infection of around 200 during 30 min. **A:** uninfected macrophages; **B:** macrophages infected with the wild-type strain; **C:** macrophages infected with the mNeonGreen-expressing strain. The micrographs represent the overlay of three fields taken with three different excitation wavelengths, showing in red the macrophage's membrane and cytosol, in blue the cell nucleus and in green the mNeonGreen-expressing mycoplasmas.

Annexes



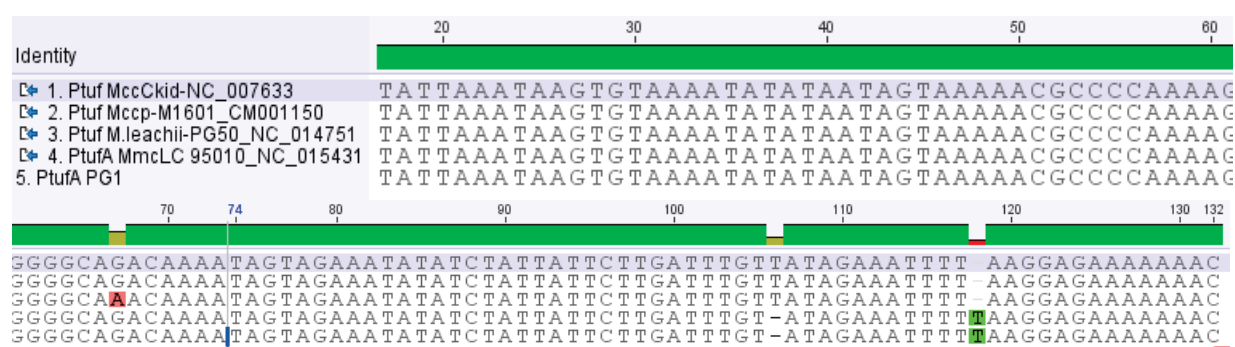
Annexe 1 : Séquestre pulmonaire. Dans les cas chroniques de PPCB, les lésions pulmonaires évoluent vers la formation de « séquestres » (flèche noire). (crédits photographiques : François Thiaucourt)

Composition du milieu LB	Pour un litre
Bactotryptone	10 grammes
Yeast extract	5 grammes
NaCl	10 grammes
pH	7,0
Agar (pour milieu solide)	15 grammes
Eau distillée	Qsp 1 litre

Annexe 2 : Composition du milieu Luria-Bertani, LB

Composition du supplément pour PPLO	Pour un litre
Sérum de cheval décomplémenté 1 heure à 56°C	500 mL
Extrait de levure frais (Lefèvre)	125 mL
pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich)	10 g
D-glucose (Sigma-Aldrich)	5 g
Ampicilline (Sigma-Aldrich)	1 g
Eau miliQ	125 mL

Annexe 3 : Composition du supplément à ajouter au milieu de base PPLO pour la culture des mycoplasmes



Annexe 4 : Alignements des séquences des promoteurs des gènes *tufA* chez différents membres du groupe mycoides

a	<i>M. bovis</i> Titre initial (UFC/mL)	30 min post	18 H post	72 H post
		infection UFC/mL	infection UFC/mL	infection UFC/mL
	WT 1E+10 (MOI 10000) + MΦ	7E+06	2E+06	2E+05
	N8 1E+10 (MOI 10000) + MΦ	7E+06	1E+06	2E+05

b	<i>Mmm</i> Titre initial (UFC/mL)	30 min post	18 H post	72 H post
		infection UFC/mL	infection UFC/mL	infection UFC/mL
	WT 1E+09 (MOI 1000) + MΦ	7E+05	2E+05	2E+05
	N6 1E+09 (MOI 1000) + MΦ	8E+05	3E+05	3E+05

Annexe 5 : Analyse quantitative de la présence de mycoplasmes vivants au cours du temps en présence de macrophages bovins. Les macrophages bovins (MΦ) ont été infectés durant 30 minutes avec *M. bovis* Oger2 ou *Mmm* Rita souche sauvage (WT) ou exprimant mNeonGreen (N8 ou N6 respectivement) à une MOI de 10000 pour *M. bovis* et 1000 pour *Mmm*. L'inoculum a été alors retiré et l'incubation a poursuivie pendant 18 et 72 heures. Les titrages ont été réalisés après grattage du contenu des puits préalablement lavés à 30 minutes, 18 heures et 72 heures post-infection. PI : post infection
MOI : multiplicité d'infection

a	<i>M. bovis</i> Titre initial (UFC/mL)	4H post		72H post		Variation	
		infection UFC/mL		infection UFC/mL		ratio entre titre à 72h et titre à 4h PI	
	5E+06 (MOI 5) + MΦ	3E+04	1E+04	1E+06	4E+05	X 33	X 40
	5E+07 (MOI 50) + MΦ	1E+05	5E+05	2E+06	3E+06	X 20	X 6
	5E+08 (MOI 500) + MΦ	1E+07	5E+06	4E+05	2E+05	÷ 25	÷ 25

b	<i>Mmm</i> Titre initial (UFC/mL)	4H post		72H post		Variation	
		infection UFC/mL		infection UFC/mL		Ratio entre titre à 72h et titre à 4h PI	
	2E+06 (MOI 2) + MΦ	2E+04	2E+04	1E+02	5E+02	÷ 200	÷ 40
	2E+07 (MOI 20) + MΦ	3E+04	1E+05	2E+02	6E+02	÷ 150	÷ 165
	2E+08 (MOI 200) + MΦ	1E+05	4E+05	3E+04	7E+03	÷ 3,3	÷ 57

Annexe 6 : Effet dose sur la survie *in vitro* et sous forme fixée de *M. bovis* Oger2 (a, rose) et *Mmm* Rita (b, vert) en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ). Les mycoplasmes ont été ajoutés à 10⁶ macrophages à différentes MOI durant 30 minutes, puis l'inoculum a été retiré et l'incubation poursuivie pendant 4 et 72 heures. Les résultats présentés sont les valeurs des titrages en UFC/mL après grattage et passage à la seringue du contenu des puits préalablement lavés de deux expériences. Ne sont quantifiés que les mycoplasmes associés soit au support plastique soit aux macrophages (intra et extra cellulièrement). PI : post infection MOI : multiplicité d'infection

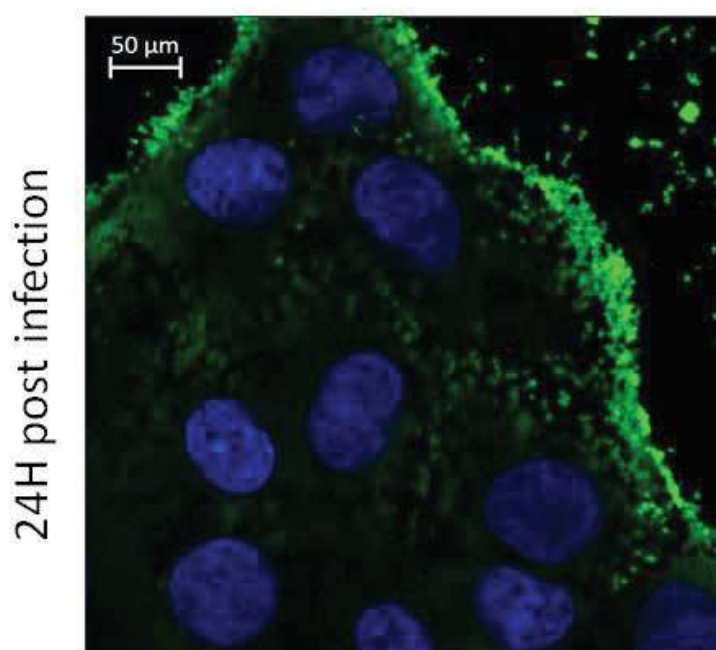
a <i>M. bovis</i> Titre initial (UFC/mL)	4H post infection UFC/mL		72H post infection UFC/mL		Variation ratio entre titre à 72h et titre à 4h PI	
5E+06 (MOI 5) + MΦ	5E+07	1E+07	2E+06	3E+06	÷ 25	÷ 3,3
5E+07 (MOI 50) + MΦ	5E+08	5E+08	8E+06	1E+06	÷ 63	÷ 100

b <i>Mmm</i> Titre initial (UFC/mL)	4H post infection UFC/mL		72H post infection UFC/mL		Variation ratio entre titre à 72h et titre à 4h PI	
5E+06 (MOI 5) + MΦ	5E+07	4E+07	2E+04	3E+03	÷ 2500	÷ 13333
5E+07 (MOI 50) + MΦ	3E+08	3E+08	4E+06	6E+06	÷ 75	÷ 50

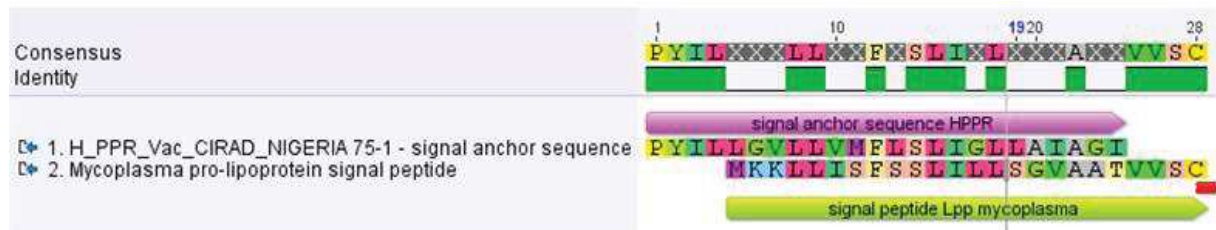
Annexe 7 : Effet dose sur la survie *in vitro* de *M. bovis* Oger2 N8 (a, rose) et *Mmm* Rita N6 (b, vert) en présence de macrophages bovins dérivés de monocytes (MΦ). Les mycoplasmes ont été ajoutés à 1. 10⁶ macrophages à différentes MOI durant 30 minutes, puis du milieu a été rajouté sans enlever l'inoculum et l'incubation s'est poursuivie pendant 4 ou 72 heures. Les résultats présentés (correspondant à deux expériences) sont les valeurs des titrages en UFC/mL obtenues après grattage et passage à la seringue du contenu des puits non lavés. Sont quantifiés la totalité des mycoplasmes vivants présents dans les puits de culture (adhéré et en suspension). Résultats obtenus dans deux expériences indépendantes. PI : post infection MOI : multiplicité d'infection

EBL

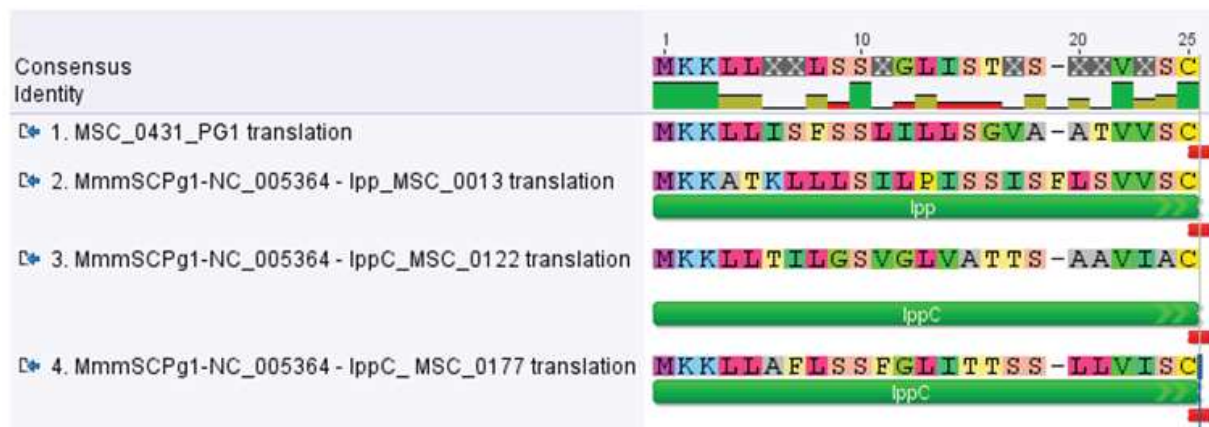
M. bovis Oger N8



Annexe 8 : contrôle de l'adhérence des mycoplasmes *M. bovis* aux lamelles de verre par rapport aux cellules EBL. Microscopie confocale des cellules EBL infectées durant 2 heures avec des mycoplasmes fluorescents à une MOI de 200. Sont représentés cellules EBL infectés avec *M. bovis* souche Oger2 N8 exprimant mNeonGreen. Les images sont réalisées après 24 heures post infection. Les noyaux sont marqués en bleu (Hoechst), les mycoplasmes sont marqués en vert (mNeonGreen). La barre d'échelle est à 50 μm. Grossissement X63.



Annexe 9 : Alignement des séquences protéiques des peptides signaux de la H-PPRV et de celui de la prolipoprotéine de *Mmm*.



Annexe 10 : Alignements des séquences protéiques des peptides signaux de différentes lipoprotéines de *Mmm*

Références bibliographiques

- Abdo, E.M., Nicolet, J., and Frey, J. (2000). Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 588–595.
- Aebi, M., Bodmer, M., Frey, J., and Pilo, P. (2012). Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet. Microbiol.* 157, 363–368.
- Aebi, M., van den Borne, B.H.P., Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P., and Bodmer, M. (2015). *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Vet. Scand.* 57, 10.
- Algire, M.A., Lartigue, C., Thomas, D.W., Assad-Garcia, N., Glass, J.I., and Merryman, C. (2009). New selectable marker for manipulating the simple genomes of *Mycoplasma* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4429–4432.
- Apley, M.D., and Coetzee, J.F. (2013). Antimicrobial Drug Use in Cattle. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, S.G.D. Medicine, DACVIMessor, Large Animal Internal, J.F.P. VetMB,essor, and P.M.D.D. Pharmacology MS, DACVIM, DACVCPessor, Veterinary Clinical, eds. (John Wiley & Sons, Inc), pp. 495–518.
- Arif, A., Schulz, J., Thiaucourt, F., Taha, A., and Hammer, S. (2007). Contagious caprine pleuropneumonia outbreak in captive wild ungulates at Al Wabra Wildlife Preservation, State of Qatar. *J. Zoo Wildl. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Zoo Vet.* 38, 93–96.
- Askaa, G., and Ernø, H. (1976). NOTE: Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to Species Rank: *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 26, 323–325.
- Aye, R., Mwirigi, M.K., Frey, J., Pilo, P., Jores, J., and Naessens, J. (2015). Cyto-adherence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* to bovine lung epithelial cells. *BMC Vet. Res.* 11, 27.
- Ayling, R.D., Baker, S.E., Peek, M.L., Simon, A.J., and Nicholas, R.A. (2000). Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.* 146, 745–747.
- Ayling, R.D., Bisgaard-Frantzen, S., March, J.B., Godinho, K., and Nicholas, R. a. J. (2005). Assessing the in vitro effectiveness of antimicrobials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type to reduce contagious bovine pleuropneumonia infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 5162–5165.
- Bailey, D., Banyard, A., Dash, P., Ozkul, A., and Barrett, T. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. *Virus Res.* 110, 119–124.

Bailey, D., Chard, L.S., Dash, P., Barrett, T., and Banyard, A.C. (2007). Reverse genetics for peste-des-petits-ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities. *Virus Res.* **126**, 250–255.

Balish, M.F., Santurri, R.T., Ricci, A.M., Lee, K.K., and Krause, D.C. (2003). Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. *Mol. Microbiol.* **47**, 49–60.

Banyard, A.C., Parida, S., Batten, C., Oura, C., Kwiatek, O., and Libeau, G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J. Gen. Virol.* **91**, 2885–2897.

Baranowski, E., Guiral, S., Sagné, E., Skapski, A., and Citti, C. (2010). Critical role of dispensable genes in *Mycoplasma agalactiae* interaction with mammalian cells. *Infect. Immun.* **78**, 1542–1551.

Behrens, A., Heller, M., Rosenbusch, R., and Kirchhoff, H. (1996). Immunoelectron microscopic localization of variable proteins on the surface of *Mycoplasma bovis*. *Microbiol. Read. Engl.* **142** (Pt 7), 1863–1871.

Belloy, L., Vilei, E.M., Giacometti, M., and Frey, J. (2003). Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. *Microbiol. Read. Engl.* **149**, 185–193.

Berhe, G., Minet, C., Le Goff, C., Barrett, T., Ngangnou, A., Grillet, C., Libeau, G., Fleming, M., Black, D.N., and Diallo, A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.* **77**, 1571–1577.

Bertin, C., Pau-Roblot, C., Courtois, J., Manso-Silván, L., Thiaucourt, F., Tardy, F., Le Grand, D., Poumarat, F., and Gaurivaud, P. (2013). Characterization of free exopolysaccharides secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *PloS One* **8**, e68373.

Bertin, C., Pau-Roblot, C., Courtois, J., Manso-Silván, L., Tardy, F., Poumarat, F., Citti, C., Sirand-Pugnet, P., Gaurivaud, P., and Thiaucourt, F. (2015). Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 676–687.

Béven, L., Charenton, C., Dautant, A., Bouyssou, G., Labroussaa, F., Skölleremo, A., Persson, A., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2012). Specific evolution of F1-like ATPases in mycoplasmas. *PloS One* **7**, e38793.

Blanchard, A. (1990). *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. *Mol. Microbiol.* **4**, 669–676.

Bonnefois, T., Vernerey, M.-S., Rodrigues, V., Totté, P., Puech, C., Ripoll, C., Thiaucourt, F., and Manso-Silván, L. (2016). Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades. *J. Biotechnol.* **236**, 35–44.

- Bonnet, F., Saillard, C., Bové, J.M., Leach, R.H., Rose, D.L., Cottew, G.S., and Tully, J.G. (1993). DNA relatedness between field isolates of *Mycoplasma* F38 group, the agent of contagious caprine pleuropneumonia, and strains of *Mycoplasma capricolum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 597–602.
- Borrel, A., Jeantet, C., and Jouan, C. (1910). Le microbe de la péripneumonie. In *Le Microbe de La Péripneumonie*, (Annales de l'Institut Pasteur), pp. 168–179.
- Brandão, E. (1995). Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC strains in sheep and goats. *Vet. Rec.* **136**, 98–99.
- Brenner, C., Wróblewski, H., Le Henaff, M., Montagnier, L., and Blanchard, A. (1997). Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces T-cell-independent B-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infect. Immun.* **65**, 4322–4329.
- Breton, M., Sagné, E., Duret, S., Béven, L., Citti, C., and Renaudin, J. (2010). First report of a tetracycline-inducible gene expression system for mollicutes. *Microbiol. Read. Engl.* **156**, 198–205.
- Breton, M., Duret, S., Béven, L., Dubrana, M.-P., and Renaudin, J. (2011). I-SceI-mediated plasmid deletion and intra-molecular recombination in *Spiroplasma citri*. *J. Microbiol. Methods* **84**, 216–222.
- Breton, M., Tardy, F., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Mick, V., Renaudin, J., Sirand-Pugnet, P., Citti, C., and Blanchard, A. (2012). Distribution and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements. *BMC Microbiol.* **12**, 257.
- Brown, R.D. (2010). Phylum XVI. Tenericutes Murray 1984a, 356VP (Effective publication: Murray 1984b, 33.). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D., Parte, A. (Eds.)), pp. 567–723.
- Brown, R.D., and Bradbury, D. (2014). The Contentious Taxonomy of Mollicutes. In *Mollicutes Molecular Biology and Pathogenesis*, (Glenn F. Browning and Christine Citti), pp. 1–14.
- Brown, R.D., and Taylor, W.P. (1966). Simultaneous vaccination of cattle against rinderpest and contagious bovine pleuropneumonia. *Bull. Epizoot. Dis. Afr. Bull. Epizoot. En Afr.* **14**, 141–146.
- Browning, G., Noormohammadi, A.H., and Markham, P.F. (2014). Identification and characterization of virulence genes in mycoplasmas. In *Mollicutes; Molecular Biology and Pathogenesis*, (Glenn F. Browning and Christine Citti), pp. 77–90.
- Bruderer, U., Regalla, J., Abdo, E.-M., Huebschle, O.J.B., and Frey, J. (2002). Serodiagnosis 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.

- Burgos, R., Pich, O.Q., Ferrer-Navarro, M., Baseman, J.B., Querol, E., and Piñol, J. (2006). *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytidhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J. Bacteriol.* *188*, 8627–8637.
- Bürki, S., Frey, J., and Pilo, P. (2015a). Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* *179*, 15–22.
- Bürki, S., Gaschen, V., Stoffel, M.H., Stojiljkovic, A., Frey, J., Kuehni-Boghenbor, K., and Pilo, P. (2015b). Invasion and persistence of *Mycoplasma bovis* in embryonic calf turbinate cells. *Vet. Res.* *46*, 53.
- 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*. *J. Med. Microbiol.* *9*, 379–391.
- Byrne, M.E., Rouch, D.A., and Skurray, R.A. (1989). Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* *81*, 361–367.
- Caufour, P., Rufael, T., Lamien, C.E., Lancelot, R., Kidane, M., Awel, D., Sertse, T., Kwiatek, O., Libeau, G., Sahle, M., et al. (2014). Protective efficacy of a single immunization with capripoxvirus-vectored recombinant peste des petits ruminants vaccines in presence of pre-existing immunity. *Vaccine* *32*, 3772–3779.
- Chang, J.-T., Liu, H.-J., and Yu, L. (2011). *Mycoplasma leachii* sp. nov. in calves, China. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 1772–1773.
- Charbonnier, G., Laveissière, G., Lancelot, R., Lefrançois, T., Minet, C., and Domenech, J. (2015). La peste des petits ruminants (CIRAD).
- Chen, H., Yu, S., Hu, M., Han, X., Chen, D., Qiu, X., and Ding, C. (2012). Identification of biofilm formation by *Mycoplasma gallisepticum*. *Vet. Microbiol.* *161*, 96–103.
- Chen, W., Hu, S., Qu, L., Hu, Q., Zhang, Q., Zhi, H., Huang, K., and Bu, Z. (2010). A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *Vaccine* *28*, 4742–4750.
- Chin, A.C., Fournier, B., Peatman, E.J., Reaves, T.A., Lee, W.Y., and Parkos, C.A. (2009). CD47 and TLR-2 cross-talk regulates neutrophil transmigration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 5957–5963.
- Chinnakannan, S.K., Nanda, S.K., and Baron, M.D. (2013). Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. *PloS One* *8*, e57063.
- Chopra-Dewasthaly, R., Zimmermann, M., Rosengarten, R., and Citti, C. (2005). First steps towards the genetic manipulation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* using the transposon Tn4001mod. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *294*, 447–453.

Chourasia, B.K., Chaudhry, R., and Malhotra, P. (2014). Delineation of immunodominant and cytoadherence segment(s) of *Mycoplasma pneumoniae* P1 gene. *BMC Microbiol.* 14, 108.

Citti, C., and Blanchard, A. (2013). *Mycoplasmas* and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.* 21, 196–203.

Citti, C., and Rosengarten, R. (1997). *Mycoplasma* genetic variation and its implication for pathogenesis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 109, 562–568.

Citti, C., Kim, M.F., and Wise, K.S. (1997). Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect. Immun.* 65, 1773–1785.

Citti, C., Browning, G., and Rosengarten, R. (2005a). Phenotypic diversity and cell invasion in host subversion by pathogenic mycoplasmas. In *Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*, (Alain Blanchard and Glenn Browning), pp. 439–483.

Citti, C., Browning, G.F., and Rosengarten, R. (2005b). Phenotypic Diversity and Cell Invasion in Host Subversion by Pathogenic Mycoplasmas. In *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*, (Alain Blanchard and Glenn Browning), pp. 439–483.

Citti, C., Nouvel, L.-X., and Baranowski, E. (2010). Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol.* 5, 1073–1085.

Cordova, C.M.M., Lartigue, C., Sirand-Pugnet, P., Renaudin, J., Cunha, R.A.F., and Blanchard, A. (2002). Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in oriC replicative plasmids. *J. Bacteriol.* 184, 5426–5435.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33–38.

Cottew, G.S., and Yeats, F.R. (1978). Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. *Aust. Vet. J.* 54, 293–296.

Cottew, G.S., Breard, A., DaMassa, A.J., Ernø, H., Leach, R.H., Lefevre, P.C., Rodwell, A.W., and Smith, G.R. (1987). Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr. J. Med. Sci.* 23, 632–635.

De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., and Borriello, S.P. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec.* 175, 325.

De la Fe, C., Assunção, P., Antunes, T., Rosales, R.S., and Poveda, J.B. (2005). Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 170, 257–259.

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

- Dedieu, L., Totte, P., Rodrigues, V., Vilei, E.M., and Frey, J. (2010). Comparative analysis of four lipoproteins from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony identifies LppA as a major T-cell antigen. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 279–290.
- Denison, A.M., Clapper, B., and Dybvig, K. (2005). Avoidance of the host immune system through phase variation in *Mycoplasma pulmonis*. *Infect. Immun.* 73, 2033–2039.
- Diallo, A., Taylor, W.P., Lefèvre, P.C., and Provost, A. (1989). [Attenuation of a strain of rinderpest virus: potential homologous live vaccine]. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 42, 311–319.
- Diallo, A., Minet, C., Berhe, G., Le Goff, C., Black, D.N., Fleming, M., Barrett, T., Grillet, C., and Libeau, G. (2002). Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 88–91.
- Diallo, A., Minet, C., Le Goff, C., Berhe, G., Albina, E., Libeau, G., and Barrett, T. (2007). The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine* 25, 5591–5597.
- Diaz-Garcia, F.J., Herrera-Mendoza, A.P., Giono-Cerezo, S., and Guerra-Infante, F.M. (2006). *Mycoplasma hominis* attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 21, 1591–1598.
- Dupuy, V., Manso-Silván, L., Barbe, V., Thebault, P., Dordet-Frisoni, E., Citti, C., Poumarat, F., Blanchard, A., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., et al. (2012). Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides* “Small Colony.” *PloS One* 7, e46821.
- Dupuy, V., Verdier, A., Thiaucourt, F., and Manso-Silván, L. (2015). A large-scale genomic approach affords unprecedented resolution for the molecular epidemiology and evolutionary history of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Res.* 46, 74.
- Duret, S., Berho, N., Danet, J.-L., Garnier, M., and Renaudin, J. (2003). Spiralin Is Not Essential for Helicity, Motility, or Pathogenicity but Is Required for Efficient Transmission of *Spiroplasma citri* by Its Leafhopper Vector *Circulifer haematiceps*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6225–6234.
- Duret, S., André, A., and Renaudin, J. (2005). Specific gene targeting in *Spiroplasma citri*: improved vectors and production of unmarked mutations using site-specific recombination. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 2793–2803.
- Dusanic, D., Bercic, R.L., Cizelj, I., Salmic, S., Narat, M., and Bencina, D. (2009). *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. *Vet. Microbiol.* 138, 114–119.
- Dybvig, K., French, C.T., and Voelker, L.L. (2000). Construction and use of derivatives of transposon Tn4001 that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. *J. Bacteriol.* 182, 4343–4347.

Edward, D.G., and Freundt, E. (1967). Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 267–268.

Edward, D.G., and Freundt, E.A. (1956). The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *J. Gen. Microbiol.* 14, 197–207.

ER Nocard, Borrel, A., Salimbeni, T., and Dujardin-Beaumetz, E. (1898). Le microbe de la péripneumonie. In *Le Microbe de La Peripneumonie*, (Annales de l'Institut Pasteur), p.

Espinosa, E., and Chillet, P. (2010). Les défenses cellulaires de l'immunité innée. In *Immunologie*, pp. 81–86.

Firrao, G., Garcia-Chapa, M., and Marzachi, C. (2007). Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 1353–1375.

Fischer, A., Shapiro, B., Muriuki, C., Heller, M., Schnee, C., Bongcam-Rudloff, E., Vilei, E.M., Frey, J., and Jores, J. (2012). The origin of the “Mycoplasma mycoides cluster” coincides with domestication of ruminants. *PloS One* 7, e36150.

Fischer, A., Santana-Cruz, I., Giglio, M., Nadendla, S., Drabek, E., Vilei, E.M., Frey, J., and Jores, J. (2013). Genome Sequence of *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a Fast-Growing *Mycoplasma* Species. *Genome Announc.* 1.

Fisseha, M., Göhlmann, H.W., Herrmann, R., and Krause, D.C. (1999). Identification and complementation of frameshift mutations associated with loss of cytoadherence in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 181, 4404–4410.

Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., et al. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397–403.

French, C.T., Lao, P., Loraine, A.E., Matthews, B.T., Yu, H., and Dybvig, K. (2008). Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol. Microbiol.* 69, 67–76.

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

Gaurivaud, P., Lakhdar, L., Le Grand, D., Poumarat, F., and Tardy, F. (2014). Comparison of in vivo and in vitro properties of capsulated and noncapsulated variants of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé: a potential new insight into the biology of contagious bovine pleuropneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.* 359, 42–49.

Gautier-Bouchardon, A.V., Ferré, S., Le Grand, D., Paoli, A., Gay, E., and Poumarat, F. (2014). Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PloS One* 9, e87672.

Gibbs, E.P., Taylor, W.P., Lawman, M.J., and Bryant, J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. *Intervirology* 11, 268–274.

Giguère, S., and Dowling, P.M. (2013). Fluoroquinolones. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, S.G.D. Medicine, DACVIMessor, Large Animal Internal, J.F.P. VetMB,essor, and P.M.D.D. Pharmacology MS, DACVIM, DACVCPessor, Veterinary Clinical, eds. (John Wiley & Sons, Inc), pp. 295–314.

Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., Hutchison, C.A., Smith, H.O., and Venter, J.C. (2006). Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 425–430.

Gómez-Martín, A., Amores, J., Paterna, A., and De la Fe, C. (2013). Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: epidemiology and prospects for diagnosis and control. *Vet. J. Lond. Engl.* 197 198, 48–56.

Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M.M., Ziegler, U., and Hoelzle, L.E. (2009). *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infect. Immun.* 77, 576–584.

Hadush, B., Eshetu, L., Mengistu, W., and Hailesilassie, M. (2009). Seroprevalence of contagious caprine pleuropneumonia in Kefta Humera, Alamata (Tigray) and Aba-'ala (Afar), Northern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 803–806.

Haffar, A., Libeau, G., Moussa, A., Cécile, M., and Diallo, A. (1999). The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res.* 64, 69–75.

Halbedel, S., and Stülke, J. (2006). Probing in vivo promoter activities in *Mycoplasma pneumoniae*: a system for generation of single-copy reporter constructs. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1696–1699.

Hale, H.H., Helmboldt, C.F., Plastring, W.N., and Stula, E.F. (1962). Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.* 52, 582–591.

Hamsten, C., Westberg, J., Bölske, G., Ayling, R., Uhlén, M., and Persson, A. (2008). Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 539–549.

Hannan, P.C., Windsor, G.D., de Jong, A., Schmeer, N., and Stegemann, M. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2037–2040.

Hegde, S., Hegde, S., Spargser, J., Brunthaler, R., Rosengarten, R., and Chopra-Dewasthaly, R. (2014). In vitro and in vivo cell invasion and systemic spreading of *Mycoplasma agalactiae* in the sheep infection model. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1024–1031.

Herbelin, A., Ruuth, E., Delorme, D., Michel-Herbelin, C., and Praz, F. (1994). *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect. Immun.* 62, 4690–4694.

Herbert, R., Baron, J., Batten, C., Baron, M., and Taylor, G. (2014). Recombinant adenovirus expressing the haemagglutinin of Peste des petits ruminants virus (PPRV) protects goats against challenge with pathogenic virus; a DIVA vaccine for PPR. *Vet. Res.* 45, 24.

Heuvelink, A., Reugebrink, C., and Mars, J. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* 189, 1–7.

Howard, C.J. (1984). Comparison of bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of *Mycoplasma bovis* by bovine alveolar macrophages and neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6, 321–326.

Howard, C.J., Stott, E.J., Thomas, L.H., Gourlay, R.N., and Taylor, G. (1987). Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parainfluenza type 3 virus, *Mycoplasma bovis* and *M. dispar*. *Vet. Rec.* 121, 372–376.

Hübschle, O.J.B., Tjipura-Zaire, G., Abusugra, I., di Francesca, G., Mettler, F., Pini, A., and Morein, B. (2003). Experimental field trial with an immunostimulating complex (ISCOM) vaccine against contagious bovine pleuropneumonia. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50, 298–303.

Hum, S., Kessell, A., Djordjevic, S., Rheinberger, R., Hornitzky, M., Forbes, W., and Gonsalves, J. (2000). Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* species bovine group 7 in dairy cattle. *Aust. Vet. J.* 78, 744–750.

Hutchison, C.A., Peterson, S.N., Gill, S.R., Cline, R.T., White, O., Fraser, C.M., Smith, H.O., and Venter, J.C. (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* 286, 2165–2169.

Ishag, H.Z.A., Liu, M.J., Yang, R.S., Xiong, Q.Y., Feng, Z.X., and Shao, G.Q. (2016). A replicating plasmid-based vector for GFP expression in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Genet. Mol. Res. GMR* 15.

Janis, C., Lartigue, C., Frey, J., Wróblewski, H., Thiaucourt, F., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2005). Versatile Use of oriC Plasmids for Functional Genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2888–2893.

Janis, C., Bischof, D., Gourgues, G., Frey, J., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2008). Unmarked insertional mutagenesis in the bovine pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: characterization of a lppQ mutant. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 2427–2436.

Jones, T.C., and Hirsch, J.G. (1971). The interaction in vitro of *Mycoplasma pulmonis* with mouse peritoneal macrophages and L-cells. *J. Exp. Med.* 133, 231–259.

- Jores, J., Fischer, A., Sirand-Pugnet, P., Thomann, A., Liebler-Tenorio, E.M., Schnee, C., Santana-Cruz, I., Heller, M., and Frey, J. (2013). *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a fast growing *Mycoplasma* species isolated from wild Caprinae. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 533–538.
- Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., and Miyata, M. (2004). Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of mycoplasma pneumoniae proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.* **186**, 6944–6955.
- Kent, B.N., Foecking, M.F., and Calcutt, M.J. (2012). Development of a novel plasmid as a shuttle vector for heterologous gene expression in *Mycoplasma yeatsii*. *J. Microbiol. Methods* **91**, 121–127.
- Khalil, D. (2016). Resistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma bovis* : mécanismes moléculaires et évolution en France. Université de Lyon,.
- Khodakaram-Tafti, A., and López, A. (2004). Immunohistopathological Findings in the Lungs of Calves Naturally Infected with *Mycoplasma bovis*. *J. Vet. Med. Ser. A* **51**, 10–14.
- King, K.W., and Dybvig, K. (1994). Transformation of *Mycoplasma capricolum* and examination of DNA restriction modification in *M. capricolum* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Plasmid* **31**, 308–311.
- Kleinschmidt, S., Spengler, J., Rosengarten, R., and Hewicker-Trautwein, M. (2013). Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* **162**, 949–953.
- Kusiluka, L.J.M., and Sudi, F.F. (2003). Review of successes and failures of contagious bovine pleuropneumonia control strategies in Tanzania. *Prev. Vet. Med.* **59**, 113–123.
- Lartigue, C., Blanchard, A., Renaudin, J., Thiaucourt, F., and Sirand-Pugnet, P. (2003). Host specificity of mollicutes oriC plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6610–6618.
- Le Grand, D., Solsona, M., Rosengarten, R., and Poumarat, F. (1996). Adaptive surface antigen variation in *Mycoplasma bovis* to the host immune response. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 267–275.
- Le Grand, D., Saras, E., Blond, D., Solsona, M., and Poumarat, F. (2004). Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. *Vet. Res.* **35**, 635–649.
- Lee, S.-W., Browning, G.F., and Markham, P.F. (2008). Development of a replicable oriC plasmid for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans*, and gene disruption through homologous recombination in *M. gallisepticum*. *Microbiol. Read. Engl.* **154**, 2571–2580.

- Li, J., Zhang, J., Zhang, N., Zhang, Y., Wu, W., and Li, J. (2015). Development of a replicative plasmid for gene expression in *Mycoplasma bovis*. *J. Microbiol. Methods* *108*, 12–18.
- Ling, S.H., Wang, X.H., Xie, L., Lim, T.M., and Leung, K.Y. (2000). Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in in vivo and in vitro fish models. *Microbiol. Read. Engl.* *146 (Pt 1)*, 7–19.
- Lloréns-Rico, V., Lluch-Senar, M., and Serrano, L. (2015). Distinguishing between productive and abortive promoters using a random forest classifier in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* *43*, 3442–3453.
- Lloyd, L.C., Buttery, S.H., and Hudson, J.R. (1971). The effect of the galactan and other antigens of *Mycoplasma mycoides* var. *Mycoides* on experimental infection with that organism in cattle. *J. Med. Microbiol.* *4*, 425–439.
- Lorenzon, S., David, A., Nadew, M., Wesonga, H., and Thiaucourt, F. (2000). Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol. Cell. Probes* *14*, 205–210.
- Lorenzon, S., Manso-Silván, L., and 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* *22*, 324–328.
- Lysnyansky, I., and Ayling, R.D. (2016). *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. *Front. Microbiol.* *7*, 595.
- Lysnyansky, I., Sachse, K., Rosenbusch, R., Levisohn, S., and Yogev, D. (1999). The *vsp* Locus of *Mycoplasma bovis*: Gene Organization and Structural Features. *J. Bacteriol.* *181*, 5734–5741.
- MacOwan, K.J., and Minette, J.E. (1976). A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.* *8*, 91–95.
- Maglennon, G.A., Cook, B.S., Matthews, D., Deeney, A.S., Bossé, J.T., Langford, P.R., Maskell, D.J., Tucker, A.W., Wren, B.W., and Rycroft, A.N. (2013a). Development of a self-replicating plasmid system for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* *44*, 63.
- Maglennon, G.A., Cook, B.S., Deeney, A.S., Bossé, J.T., Peters, S.E., Langford, P.R., Maskell, D.J., Tucker, A.W., Wren, B.W., Rycroft, A.N., et al. (2013b). Transposon mutagenesis in *Mycoplasma hyopneumoniae* using a novel mariner-based system for generating random mutations. *Vet. Res.* *44*, 124.
- Mah, T.F., and O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* *9*, 34–39.
- Manso-Silván, L., Perrier, X., and 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *57*, 2247–2258.

- Manso-Silván, L., Vilei, E.M., Sachse, K., Djordjevic, S.P., Thiaucourt, F., and Frey, J. (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1353–1358.
- Manso-Silván, L., Dupuy, V., Chu, Y., and Thiaucourt, F. (2011). Multi-locus sequence analysis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* for the molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Res.* **42**, 86.
- Marenda, M.S., Sagné, E., Poumarat, F., and Citti, C. (2005). Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiol. Read. Engl.* **151**, 475–489.
- Mariner, J.C., and Catley, A. (2004). The dynamics of CBPP endemism and development of effective control strategies. pp. 76–80.
- Marshall, A.J., Miles, R.J., and Richards, L. (1995). The phagocytosis of mycoplasmas. *J. Med. Microbiol.* **43**, 239–250.
- Marzi, S., Myasnikov, A.G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M., and Klaholz, B.P. (2007). Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* **130**, 1019–1031.
- Masiga, W.N., and Windsor, R.S. (1978). Some evidence of an age susceptibility to contagious bovine pleuropneumonia. *Res. Vet. Sci.* **24**, 328–333.
- Matteau, D., Pepin, M.-E., Baby, V., Gauthier, S., Arango Giraldo, M., Knight, T.F., and Rodrigue, S. (2017). Development of oriC-Based Plasmids for *Mesoplasma florum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**.
- Maunsell, F.P., Donovan, G.A., Risco, C., and Brown, M.B. (2009). Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine* **27**, 2781–2788.
- Maunsell, F.P., Woolums, A.R., Francoz, D., Rosenbusch, R.F., Step, D.L., Wilson, D.J., and Janzen, E.D. (2011). *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* **25**, 772–783.
- Mbulu, R.-S., Tjipura-Zaire, G., Lelli, R., Frey, J., Pilo, P., Vilei, E.M., Mettler, F., Nicholas, R.A.J., and Huebschle, O.J.B. (2004). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.* **98**, 229–234.
- McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K., Ayling, R.D., and Nicholas, R. a. J. (2006). Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiol.-Sgm* **152**, 913–922.
- McAuliffe, L., Ayling, R.D., Ellis, R.J., and Nicholas, R.A.J. (2008). Biofilm-grown *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC exhibit both phenotypic and genotypic variation compared with planktonic cells. *Vet. Microbiol.* **129**, 315–324.

van der Merwe, J., Prysliaik, T., and Perez-Casal, J. (2010). Invasion of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells and Erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* 78, 4570–4578.

Meyer, G., and Diallo, A. (1995). The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: the long untranslated region in the 5'-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus Res.* 37, 23–35.

Mulongo, M., Frey, J., Smith, K., Schnier, C., Wesonga, H., Naessens, J., and McKeever, D. (2015). Vaccination of cattle with the N terminus of LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* results in type III immune complex disease upon experimental infection. *Infect. Immun.* 83, 1992–2000.

Mulongo, M.M., Frey, J., Smith, K., Schnier, C., Wesonga, H., Naessens, J., and McKeever, D. (2013). Cattle immunized against the pathogenic L- α -glycerol-3-phosphate oxidase of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* fail to generate neutralizing antibodies and succumb to disease on challenge. *Vaccine* 31, 5020–5025.

Mwirigi, M., Nkando, I., Aye, R., Soi, R., Ochanda, H., Berberov, E., Potter, A., Gerdt, V., Perez-Casal, J., Naessens, J., et al. (2016). Experimental evaluation of inactivated and live attenuated vaccines against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 169, 63–67.

Nicholas, R. a. J., and Ayling, R.D. (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* 74, 105–112.

Nicholas, R., Tipura-Zaire, G., Mbulu, R.-S., Scacchia, M., Mettler, F., Frey, J., Abusugra, I., and Huebschle, O.J. (2003). An inactivated whole cell vaccine and LppQ subunit vaccine appear to exacerbate the effect of CBPP in adult cattle. pp. 91–97.

Nicholas, R., Ayling, R., and McAuliffe, L. (2008). *Mycoplasma* diseases of ruminants (Wallingford: CABI).

Okusawa, T., Fujita, M., Nakamura, J., Into, T., Yasuda, M., Yoshimura, A., Hara, Y., Hasebe, A., Golenbock, D.T., Morita, M., et al. (2004). Relationship between Structures and Biological Activities of Mycoplasmal Diacylated Lipopeptides and Their Recognition by Toll-Like Receptors 2 and 6. *Infect. Immun.* 72, 1657.

Ozdemir, U., Ozdemir, E., March, J.B., Churchward, C., and Nicholas, R. a. J. (2005). Contagious caprine pleuropneumonia in the Thrace region of Turkey. *Vet. Rec.* 156, 286–287.

Parida, S., Muniraju, M., Mahapatra, M., Muthuchelvan, D., Buczkowski, H., and Banyard, A.C. (2015). Peste des petits ruminants. *Vet. Microbiol.* 181, 90–106.

Persson, A., Jacobsson, K., Frykberg, L., Johansson, K.-E., and Poumarat, F. (2002). Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *J. Bacteriol.* 184, 3712–3722.

- Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bölske, G., Uhlen, M., and 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.
- Peyraud, A., Woubit, S., Poveda, J.B., De la Fe, C., Mercier, P., and Thiaucourt, F. (2003). A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Mol. Cell. Probes* *17*, 289–294.
- Peyraud, A., Poumarat, F., Tardy, F., Manso-Silván, L., Hamroev, K., Tilloev, T., Amirbekov, M., Tounkara, K., Bodjo, C., Wesonga, H., et al. (2014). An international collaborative study to determine the prevalence of contagious caprine pleuropneumonia by monoclonal antibody-based cELISA. *BMC Vet. Res.* *10*, 48.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E., and Piñol, J. (2006). *Mycoplasma genitalium* mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytoadherence. *Mol. Microbiol.* *60*, 1509–1519.
- Pilo, P., Martig, S., Frey, J., and Vilei, E.M. (2003). Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein lppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Res.* *34*, 761–775.
- Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D., and 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., and Vilei, E.M. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. J. Lond. Engl.* *197*, 513–521.
- Plempner, R.K., Hammond, A.L., and Cattaneo, R. (2000). Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. *J. Virol.* *74*, 6485–6493.
- Poumarat, F., Longchambon, D., and Martel, J.L. (1992). Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within “*M. mycoides* cluster” and within “glucose and arginine-negative cluster” of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* *32*, 375–390.
- Poumarat, F., Solsona, M., and Boldini, M. (1994). Genomic, protein and antigenic variability of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* *40*, 305–321.
- Pour-El, I., Adams, C., and Minion, F.C. (2002). Construction of mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid* *47*, 129–137.
- Provost AP, P., Breard, A., Le Goff, C., Martel, J.L., and Cottew, G.S. (1987). Contagious bovine pleuropneumonia. In *Revue Scientifique et Technique Office International Des Epizooties*, pp. 625–679.
- Prysiak, T., and Perez-Casal, J. (2016). Immune responses to *Mycoplasma bovis* proteins formulated with different adjuvants. *Can. J. Microbiol.* *62*, 492–504.

Radaelli, E., Castiglioni, V., Losa, M., Benedetti, V., Piccinini, R., Nicholas, R. a. J., Scanziani, E., and Luini, M. (2011). Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. *Res. Vet. Sci.* *91*, 251–253.

Razin, S. (1985). *Mycoplasma Adherence*. In *The Mycoplasma IV Mycoplasma Pathogenicity*, (S. Razin and M.F. Barile), pp. 161–202.

Razin, S. (1999). Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Biosci. Rep.* *19*, 367–372.

Razin, S., and Oliver, O. (1961). Morphogenesis of *Mycoplasma* and bacterial L-form colonies. *J. Gen. Microbiol.* *24*, 225–237.

Regalla, J., Caporale, V., Giovannini, A., Santini, F., Martel, J.L., and Gonçalves, A.P. (1996). Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *15*, 1309–1329.

Renaudin, J., Browning, G., and Citti, C. (2014). Molecular genetic tools for Mollicutes. In *Mollicutes; Molecular Biology and Pathogenesis*, (UK: Glenn F. Browning and Christine Citti), pp. 55–76.

Renaudin, J., Béven, L., Batailler, B., Duret, S., Desqué, D., Arricau-Bouvery, N., Malembic-Maher, S., and Foissac, X. (2015). Heterologous expression and processing of the flavescence dorée phytoplasma variable membrane protein VmpA in *Spiroplasma citri*. *BMC Microbiol.* *15*, 82.

Rurangirwa, F.R., McGuire, T.C., Kibor, A., and Chema, S. (1987). An inactivated vaccine for contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.* *121*, 397–400.

Rweyemamu, M.M., Litamoi, J., Palya, V., and Sylla, D. (1995). Contagious bovine pleuropneumonia vaccines: the need for improvements. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *14*, 593–601.

Sachse, K., Grajetzki, C., Rosengarten, R., Hänel, I., Heller, M., and Pfützner, H. (1996). Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralblatt Bakteriologie. Int. J. Med. Microbiol.* *284*, 80–92.

Sachse, K., Helbig, J.H., Lysnyansky, I., Grajetzki, C., Müller, W., Jacobs, E., and Yogev, D. (2000). Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect. Immun.* *68*, 680–687.

Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al. (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* *132*, 487–498.

Salah, W. (2008). UTILISATION D'UNE SEQUENCE COMPLETE DU GENOME D'UNE SOUCHE DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* LC POUR LA MISE AU POINT DE TESTS DE DIAGNOSTIC, APPLICATION A L'EXPRESSION DE GENES HETEROLOGUES.

Sanz Bernardo, B., Goodbourn, S., and Baron, M.D. (2017). Control of the induction of type I interferon by Peste des petits ruminants virus. *PloS One* 12, e0177300.

Scanziani, E., Paltrinieri, S., Boldini, M., Grieco, V., Monaci, C., Giusti, A.M., and Mandelli, G. (1997). Histological and immunohistochemical findings in thoracic lymph nodes of cattle with contagious bovine pleuropneumonia. *J. Comp. Pathol.* 117, 127–136.

Schieck, E., Lartigue, C., Frey, J., Voza, N., Hegermann, J., Miller, R.A., Valguarnera, E., Muriuki, C., Meens, J., Nene, V., et al. (2016). Galactofuranose in *Mycoplasma mycoides* is important for membrane integrity and conceals adhesins but does not contribute to serum resistance. *Mol. Microbiol.* 99, 55–70.

Schnell, M.J., and Conzelmann, K.K. (1995). Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology* 214, 522–530.

Schott, C., Cai, H., Parker, L., Bateman, K.G., and Caswell, J.L. (2014). Hydrogen peroxide production and free radical-mediated cell stress in *Mycoplasma bovis* pneumonia. *J. Comp. Pathol.* 150, 127–137.

Sen, A., Saravanan, P., Balamurugan, V., Rajak, K.K., Sudhakar, S.B., Bhanuprakash, V., Parida, S., and Singh, R.K. (2010). Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Rev. Vaccines* 9, 785–796.

Shahid, M.A., Marenda, M.S., Markham, P.F., and Noormohammadi, A.H. (2014). Development of an oriC vector for use in *Mycoplasma synoviae*. *J. Microbiol. Methods* 103, 70–76.

Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572.

Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chammass, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., et al. (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat. Methods* 10, 407–409.

Sharma, S., Citti, C., Sagné, E., Marenda, M.S., Markham, P.F., and Browning, G.F. (2015). Development and host compatibility of plasmids for two important ruminant pathogens, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. *PloS One* 10, e0119000.

Simmons, G.C., and Johnston, L. a. Y. (1963). Arthritis in Calves Caused by *Mycoplasma* Sp. *Aust. Vet. J.* 39, 11–14.

Simmons, W.L., and Dybvig, K. (2009). *Mycoplasma* Biofilms Ex Vivo and In Vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 77.

Sinnathamby, G., Renukaradhya, G.J., Rajasekhar, M., Nayak, R., and Shaila, M.S. (2001). Immune responses in goats to recombinant hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Peste des petits ruminants virus: identification of a T cell determinant. *Vaccine* 19, 4816–4823.

Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., and Blanchard, A. (2007). Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res. Microbiol.* *158*, 754–766.

Srivastava, N.C., Thiaucourt, F., Singh, V.P., Sunder, J., and Singh, V.P. (2000). Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India. *Vet. Rec.* *147*, 520–521.

Suleman, M., Prysliak, T., Clarke, K., Burrage, P., Windeyer, C., and Perez-Casal, J. (2016). *Mycoplasma bovis* isolates recovered from cattle and bison (*Bison bison*) show differential in vitro effects on PBMC proliferation, alveolar macrophage apoptosis and invasion of epithelial and immune cells. *Vet. Microbiol.* *186*, 28–36.

Szczepanek, S.M., and Silbart, L.K. (2014). Host Immune Responses to *Mycoplasma*. In *Mollicutes Molecular Biology and Pathogenesis*, (Glenn F. Browning and Christine Citti), p. 273.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Mühlradt, P.F., and Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 554–557.

Tardy, F., Maigre, L., Poumarat, F., and Citti, C. (2009). Identification and distribution of genetic markers in three closely related taxa of the *Mycoplasma mycoides* cluster: refining the relative position and boundaries of the *Mycoplasma* sp. bovine group 7 taxon (*Mycoplasma leachii*). *Microbiol. Read. Engl.* *155*, 3775–3787.

Tardy, F., Baranowski, E., Nouvel, L.-X., Mick, V., Manso-Silván, L., Thiaucourt, F., Thébault, P., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., Blanchard, A., et al. (2012). Emergence of atypical *Mycoplasma agalactiae* strains harboring a new prophage and associated with an alpine wild ungulate mortality episode. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 4659–4668.

Terahara, N., Tulum, I., and Miyata, M. (2017). Transformation of crustacean pathogenic bacterium *Spiroplasma eriocheiris* and expression of yellow fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *487*, 488–493.

Teshale, S. (2005). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) post-vaccinal complication in Ethiopia Complication apres la vaccination contre la peripneumonie contagieuse bovine (PPCB) en Ethiopie. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* *53*, 242–250.

Theiss, P., and Wise, K.S. (1997). Localized frameshift mutation generates selective, high-frequency phase variation of a surface lipoprotein encoded by a mycoplasma ABC transporter operon. *J. Bacteriol.* *179*, 4013–4022.

Thiaucourt, F., and Bölske, G. (1996). Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *15*, 1397–1414.

- Thiaucourt, F., Lorenzon, S., David, A., and Breard, A. (2000a). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.* **72**, 251–268.
- Thiaucourt, F., Yaya, A., Wesonga, H., Huebschle, O.J., Tulasne, J.J., and Provost, A. (2000b). Contagious bovine pleuropneumonia. A reassessment of the efficacy of vaccines used in Africa. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **916**, 71–80.
- Thiaucourt, F., Manso-Silvan, L., Salah, W., Barbe, V., Vacherie, B., Jacob, D., Breton, M., Dupuy, V., Lomenech, A.M., Blanchard, A., et al. (2011). *Mycoplasma mycoides*, from “mycoides Small Colony” to “capri”. A microevolutionary perspective. *BMC Genomics* **12**, 114.
- Thomas, P. (1873). Rapport médical sur le Bou-Frida. *Publ. Gouv. Général Civ. Algér.* 1–35.
- Thomas, A., Sachse, K., Farnir, F., Dizier, I., Mainil, J., and Linden, A. (2003). Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microb. Pathog.* **34**, 141–148.
- Thompson, C.C., Vieira, N.M., Vicente, A.C.P., and Thompson, F.L. (2011). Towards a genome based taxonomy of *Mycoplasmas*. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1798–1804.
- Totté, P., Puech, C., Rodrigues, V., Bertin, C., Manso-Silvan, L., and Thiaucourt, F. (2015). Free exopolysaccharide from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* possesses anti-inflammatory properties. *Vet. Res.* **46**.
- Tulum, I., Yabe, M., Uenoyama, A., and Miyata, M. (2014). Localization of P42 and F(1)-ATPase α -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. *J. Bacteriol.* **196**, 1815–1824.
- Vilei, E.M., Abdo, E.M., Nicolet, J., Botelho, A., Gonçalves, R., and Frey, J. (2000). Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiol. Read. Engl.* **146** (Pt 2), 477–486.
- Vogl, G., Plaickner, A., Szathmary, S., Stipkovits, L., Rosengarten, R., and Szostak, M.P. (2008). *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infect. Immun.* **76**, 71–77.
- Waldo, R.H., Jordan, J.L., and Krause, D.C. (2005). Identification and complementation of a mutation associated with loss of *Mycoplasma pneumoniae* virulence-specific proteins B and C. *J. Bacteriol.* **187**, 747–751.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., and Van Etten, J. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171**, 6455–6467.
- Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K.-E., Pettersson, B., and Uhlén, M. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp.

mycoides SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.* **14**, 221–227.

Winner, F., Rosengarten, R., and Citti, C. (2000). In Vitro Cell Invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* **68**, 4238–4244.

Wise, K.S., Foecking, M.F., Röske, K., Lee, Y.J., Lee, Y.M., Madan, A., and Calcutt, M.J. (2006). Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation- based phase variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster. *J. Bacteriol.* **188**, 4926–4941.

Wise, K.S., Calcutt, M.J., Foecking, M.F., Röske, K., Madupu, R., and Methé, B.A. (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523). *Infect. Immun.* **79**, 982–983.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271.

Woubit, S., Lorenzon, S., Peyraud, A., Manso-Silván, L., and Thiaucourt, F. (2004). A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.* **104**, 125–132.

Yu, Z., Wang, T., Sun, H., Xia, Z., Zhang, K., Chu, D., Xu, Y., Xin, Y., Xu, W., Cheng, K., et al. (2013). Contagious caprine pleuropneumonia in endangered Tibetan antelope, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 2051–2053.

Zelmer, A., Carroll, P., Andreu, N., Hagens, K., Mahlo, J., Redinger, N., Robertson, B.D., Wiles, S., Ward, T.H., Parish, T., et al. (2012). A new in vivo model to test anti-tuberculosis drugs using fluorescence imaging. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1948–1960.

Zeng, Y., Liu, L., He, J., Liu, Y., Zhu, C., You, X., and Wu, Y. (2012). Screening and identification of the mimic epitope of the adhesion protein of *Mycoplasma genitalium*. *Can. J. Microbiol.* **58**, 898–908.

Zhou, Y., Wang, Y., Li, Y., Nick, N., Zou, X., Bai, F., Wu, J., and Xin, J. (2016). P19 contributes to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* adhesion to EBL cells. *Microb. Pathog.* **93**, 13–21.

Zimmerman, C.-U., and Herrmann, R. (2005). Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 315–321.

Résumé

Un mini-transposon qui permet une mutagenèse stable et non marquée a été modifié pour permettre l'expression de gènes chez les mycoplasmes. Cet outil a tout d'abord été utilisé pour le développement de mycoplasmes fluorescents. Pour ce faire, les protéines mCherry, mKO2 et mNeonGreen ont été insérées dans le chromosome de deux espèces de mycoplasmes phylogénétiquement distants : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) et *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*). Cette insertion a permis l'observation sans précédent de colonies fluorescentes vertes et rouges chez les deux espèces et ce, sans toxicité apparente. De plus, des niveaux de fluorescence

équivalents ont été quantifiés par cytométrie en flux chez les deux espèces, ce qui suggère que l'outil développé peut être largement utilisé chez les mycoplasmes. Ces mycoplasmes fluorescents ont ensuite été utilisés pour effectuer des études d'adhésion, d'invasion et de persistance de ces deux espèces de mycoplasmes avec différents types cellulaires bovins. Ces analyses ont confirmé que *M. bovis* présente de meilleures capacités d'adhésion et prolifération au support de culture, ainsi qu'aux cellules embryonnaires épithéliales qu'il envahit. Il présente aussi une meilleure résistance à l'élimination par les macrophages. Néanmoins, *Mmm* a aussi été détecté à l'intérieur des macrophages après 72 heures d'infection, et ce, même à des MOI faibles et en présence de concentrations bactériostatiques d'antibiotique. Ensuite, le système d'expression a été utilisé pour tester la possibilité d'utiliser les mycoplasmes en tant que vecteurs vaccinaux. Le gène de la protéine H du virus de la peste des petits ruminants, utilisé avec succès dans des vaccins recombinants, a été inséré dans un mycoplasme caprin comme preuve de concept d'un vaccin multivalent. Cependant, malgré la détection d'ARNm spécifique, l'expression de la protéine virale n'a pas été mise en évidence, et ce, malgré le recours à une technique très sensible de détection par spectrométrie de masse. La preuve de concept n'a donc pas pu être réalisée. Pour conclure, les systèmes d'expression de gènes de fluorescences développés dans ces travaux sont bien adaptés aux études d'interaction hôte-pathogène et offrent une multitude de perspectives pour l'analyse fonctionnelle chez les mycoplasmes *in vitro* et *in vivo*.

Mot clés : Mycoplasmes, expression de gènes, fluorescence, vecteur vaccinal, interaction hôte-pathogène.

Summary

A mini-transposon affording unmarked, stable mutagenesis in mycoplasmas was modified to allow gene expression. This tool was first used for the development of fluorescence expression for stable and innocuous whole mycoplasma cell labelling. For this purpose, the fluorescent proteins GFP2, mCherry, mKO2 and mNeonGreen were introduced as chromosomal tags in the phylogenetically distant species *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) and *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), resulting in the unprecedented observation of red and green fluorescent mycoplasma colonies in the two species, with no apparent cytotoxicity. Equivalent fluorescence expression levels were quantified by flow cytometry in both species, suggesting that these tools can be broadly applied in mycoplasmas. These fluorescent mycoplasmas were then used to compare the adhesion, invasion and persistence of the two species in different bovine cells. They notably confirmed that *M. bovis* shows a higher adhesion and proliferation capacity to the inert culture surface and higher adhesion to embryonic lung epithelial cells, which it invades. It also shows an increased resistance to elimination by macrophages. However, fluorescent *Mmm* were also detected inside the phagocytes 72h post-infection, even at a low MOI. Finally, the expression vector was used to assess the possible use of mycoplasmas as vaccine vectors. For this purpose, we introduced the H gene of the "peste des petits ruminants" virus, already used in effective recombinant vaccines, in a caprine mycoplasma as proof-of-concept of a mycoplasma-based multivalent vaccine. However, despite the detection of specific mRNA, the expression of the viral protein could not be evidenced using a highly sensitive peptide detection technique by mass spectrometry, so this proof-of-concept could not be obtained. Still, the fluorescence expression tools developed in this study are suitable for host-pathogen interaction studies and offer innumerable perspectives for the functional analysis of mycoplasmas both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Mycoplasma, gene expression, fluorescence, vaccine vector, host-pathogen interactions.

