

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

Option : Biologie cellulaire et moléculaire

par

Gérard PAPIEROK



**Extraction d'antigènes protéiques
à partir de membranes isolées de Mycoplasma-pneumoniae
et mise au point d'une technique immunoenzymatique**

Présentée le 31 octobre 1984, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM les Professeurs	J. GUILLAUME	Président
	J.C. DERIEUX	Rapporteur
	J. KREMBEL	Examineurs
	P. WATTRE	

Je dédie ce travail

à mon épouse Aline,

à Céline,

à tous ceux qui me sont chers.

A Monsieur le Professeur J. GUILLAUME

qui m'a chaleureusement accepté au sein de son
laboratoire de Microbiologie de l'Université des
Sciences et Techniques de Lille.

Vous me faites le grand honneur de présider cette
thèse.

Soyez assuré de toute ma gratitude et veuillez
trouver, dans cette ouvrage, l'expression de mon
plus profond respect.

A Monsieur le Professeur J. C. DERIEUX

Pendant ces quelques années de 3ème cycle, j'ai pu bénéficier de votre esprit de synthèse et de votre grande culture scientifique.

Vous avez, en grande partie, inspiré et guidé ce travail et l'intérêt que vous lui avez toujours manifesté m'a été d'un grand réconfort.

Votre aide morale et scientifique m'ont très souvent aidé. Que ce travail soit pour vous le témoignage de toute ma reconnaissance.

Je vous dois beaucoup et vous exprime ma plus profonde admiration.

A Monsieur le Professeur J. KREMBEL

J'ai souvent pu apprécier votre disponibilité au cours de mes études à la Faculté malgré vos multiples charges.

Je vous prie de bien vouloir trouver ici, l'expression de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur P. WATTRE

J'ai été très touché de l'intérêt qu'il vous a plu de réserver à ce travail.

Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Docteur P. ROUSSEAU

mon employeur, qui m'a initié à la pratique de la
biologie médicale et auprès duquel j'ai toujours
trouvé les encouragements nécessaires à la réali-
sation de ce travail.

A Monsieur A. DAUNIZEAU, pharmacien biologiste au centre
hospitalier de Douai,

qui est à l'origine de ce sujet et m'a conseillé tout
au long de cette étude.

A tous mes amis, collègues et collaborateurs :

- du Centre Hospitalier de Douai.
- du Laboratoire Rousseau à Douai.
- du laboratoire de chimie biologique (Professeur Montreuil) de l'Université des Sciences et Techniques.
- du laboratoire de microbiologie (Professeur Guillaume) de L'université des Sciences et Techniques.
- du laboratoire de biochimie (Professeur Dautrevaux) de la faculté de médecine.
- de laboratoire de biochimie (Professeur Fruchart) de la faculté de pharmacie.
- de l'Institut Pasteur de Lille.

Je tiens à remercier particulièrement, pour le travail qu'ils ont accompli et l'aide qu'ils m'ont apportée :

- Monsieur CHERON, Docteur es-Sciences, maître assistant
(laboratoire de chimie biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE).
qui m'a conseillé dans les techniques de fractionnement des protéines membranaires par électrophorèse.
- Madame FIEVET Catherine, Docteur es-Sciences, maître de recherche CNRS (laboratoire de biochimie de la faculté de Pharmacie)
qui m'a conseillé dans les techniques immunoenzymatiques de détection des anticorps.
- Monsieur DEFIVES, maître assistant (laboratoire de microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille).
qui m'a initié aux techniques de microscopie électronique et a activement participé à la réalisation de publications portant sur *Mycoplasma-pneumoniae*.
- Madame MASSE, responsable du service documentations de l'Institut Pasteur de Lille, qui a toujours répondu favorablement à mes demandes de publications.
- Monsieur ZIEMNIAK, photographe amateur, qui a porté un grand intérêt à effectuer les montages photographiques de cet ouvrage.
- Mademoiselle LE GUELTE Nathalie, qui a assuré la dactylographie de ce travail.

Les membranes du procaryote *Mycoplasma pneumoniae* sont obtenues par une lyse aux ultrasons suivie d'une centrifugation différentielle.

Les protéines membranaires sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium. La localisation des protéines en cours de migration est réalisée à l'aide de sérum albumine bovine précolorée au rémazol brilliant blue R. Après sectionnement des gels d'acrylamide, les disques de gel qui contiennent les protéines lourdes sont inclus dans un gel plus poreux, ces protéines sont récupérées par élution électrophorétique.

Après avoir vérifié l'antigénicité de l'éluat par réaction d'immunoprécipitation d'Ouchterlony, une technique immunoenzymatique (ELISA) est mise au point pour la détection d'anticorps anti *M. pneumoniae*.

Mots clefs: *Mycoplasma pneumoniae*, protéine, élution électrophorétique, rémazol brilliant blue R, ELISA.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

CFU	: Colony Forming Unit.
DO	: Densité Optique.
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate.
Tris	: Tris (hydroxy methyl) aminomethane.
PBS	: Phosphate Buffer Saline.
PAGE	: Polyacrylamide Gel electrophoresis.
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
SAB	: Sérum Albumine Bovine.
RBBR	: Remazol Brilliant Blue R.
CFT	: Complement Fixation Test.
Ag	: Antigène.
Ac	: Anticorps.

TABLE DES MATIERES

	Pages
AVANT PROPOS	1
INTRODUCTION GENERALE	3
REVUE GENERALE SUR MYCOPLASMA PNEUMONIAE	6
I - <u>Historique</u>	7
II - <u>Origine</u>	8
III - <u>Physiologie et ultrastructure de M. pneumoniae</u>	
A - Originalités des mycoplasmes	10
B - Ultrastructure de M. pneumoniae	11
C - La membrane de M. pneumoniae	
1 - Composition	12
1.1 - Les lipides	
1.2 - Les protéines	16
2 - Fonctions de la membrane	17
2.1 - Support antigénique	
2.2 - Activités enzymatiques	
2.3 - Le transport	
2.4 - La mobilité	
2.5 - L'adhésion	18
IV - <u>Pathogénicité, immunité et infections à M. pneumoniae</u>	20

A - Causes de la pathogénicité	20
1 - Importance de l'adhésion de <i>M. pneumoniae</i> sur les cellule hôtes	
2 - Conséquences de l'adhésion de <i>M. pneumoniae</i> sur l'épithélium respiratoire	
2.1 - Modifications de la cellule épithéliale ciliée	
2.2 - Libération de substances toxiques	21
2.3 - Développement d'auto anticorps chez l'hôte	21
B - Immunité induite par <i>M. pneumoniae</i>	23
C - Les infections à <i>M. pneumoniae</i>	24
1 - Infection majeure : la pneumonie	
2 - Autres affections respiratoires	25
3 - Affections satellites extra respiratoires	
4 - Thérapie	
4.1 - Antibiothérapie	26
4.2 - Les vaccins	
V - <u>Diagnostic biologique des infections à <i>M. pneumoniae</i></u>	27
A - Diagnostic direct : isolement et identification de <i>M. pneumoniae</i>	
1 - Milieux utilisés	
2 - Isolement de <i>M. pneumoniae</i>	28
2.1 - Les prélèvements	
2.2 - Inoculation et conditions de culture	
2.3 - Identification	29
B - Diagnostic sérologique	31
1 - Techniques sérologiques classiques	
1.1 - Immunofluorescence indirecte	
1.2 - L'hémagglutination indirecte et l'inhibition de l'hémagglutinine de <i>M. pneumoniae</i>	

1.3 - Les réactions d'inhibition de croissance et d'inhibition métabolique	32
1.4 - La réaction de fixation du complément CFT	
1.5 - Autres réactions utilisées	33
2 - Nouvelles techniques sérologiques	34
2.1 - La radioimmunologie	
2.2 - Enzyme-Linked-Immunesorbent-assay ELISA	35

TRAVAUX PERSONNELS

PREPARATION DES MEMBRANES DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE	38
I - <u>Introduction</u>	39
II - <u>Matériel et méthodes</u>	42
A - Culture	
1 - Souche	
1.1 - Origine	
1.2 - Clonage et stockage de la souche	
2 - Conditions de culture	43
2.1 - Milieu utilisé	
2.2 - Incubation	44
B - Obtention des cellules de mycoplasme	45
1 - Vérification des cultures avant centrifugation	
1.1 - Observation directe	
1.2 - Repiquage sur milieu usuel	46
1.3 - Repiquage sur gélose pour <i>M. pneumoniae</i>	
2 - Centrifugation des milieux de culture	
3 - Lavage et stockage des culots cellulaires	47
C - Lyse de <i>M. pneumoniae</i>	
1 - Evaluation du degré de lyse	
2 - Lyse osmotique	48
3 - Lyse osmotique précédée d'un précontact au glycérol	50
4 - Lyse enzymatique	
4.1 - Principe d'action des 2 enzymes lipolytiques	

4.2 - Enzymes utilisés	51
4.3 - Action de la lipase seule	52
4.4 - Action de la phospholipase A ₂ seule	53
4.5 - Action simultanée de la lipase et de la phospholipase A ₂	55
4.6 - Actions séparées de la lipase et de la phospholipase A ₂	56
5 - Lyse par action des ultrasons	
D - Obtention des membranes de <i>M. pneumoniae</i> par centrifugation différentielle	57
E - Microscopie électronique	
III - <u>Résultats et discussion</u>	60
A - Contenu des cultures	
1 - Aspect des colonies de <i>M. pneumoniae</i> sur milieu solide	
2 - Concentration en microorganismes des milieux de culture	
B - Lyse étudiée par les variations de DO à 500 nm	61
1 - Lyse osmotique	
2 - Lyse enzymatique	
3 - Lyse par action des ultrasons	64
C - Observation au microscope électronique des fractions cellulaire et membranaire de <i>M. pneumoniae</i>	65
EXTRACTION DES ANTIGENES MEMBRANAIRES PROTEIQUES DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE	72
I - <u>Introduction</u>	73
II - <u>Matériel et méthodes</u>	77

A - Dosage des protéines	77
1 - Des fractions cellulaires et membranaires	
2 - Des éluats	
B - Fractionnement des protéines membranaires de <i>M. pneumoniae</i> selon la méthode de Laemmli	
1 - Principe	
2 - Appareillage	78
2.1 - Cuve d'électrophorèse	
2.2 - Générateur	79
3 - Préparation des gels	79
4 - Préparation des échantillons	
4.1 - Echantillons membranaires	
4.2 - Echantillons de protéines standards de masses moléculaires connues	80
5 - Migration	81
6 - Fixation, coloration, décoloration	82
7 - Conservation des gels	83
C - Obtention des protéines membranaires lourdes	
1 - 1er temps : localisation des protéines lors de la séparation électrophorétique par coélectrophorèse de sérum albumine bovine (SAB) précolorée au Remazol Brilliant Blue R (RBBR)	
2 - 2nd temps : Elution électrophorétique des protéines lourdes dans les sacs de dialyse	84
D - Méthode pour l'étude de l'antigénicité des protéines électroéluées	86
1 - Préparation des immunosérums	
2 - Méthode d'Ouchterlony : réaction d'immunoprécipitation en gel d'agarose par double diffusion bidimensionnelle	89

III - <u>Résultats et discussion</u>	91
A - Fractionnement des protéines membranaires de <i>M. pneumoniae</i>	
1 - Gel de séparation à 10 % d'acrylamide	
2 - Gel de séparation à 7,5 % d'acrylamide	94
3 - Gel de séparation à 13 % d'acrylamide	
B - Etude du contenu protéique de l'éluat	
1 - Etude qualitative	
2 - Etude antigénique	95
MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI MYCOPLASMA PNEUMONIAE A L'AIDE DES ANTIGENES PROTEIQUES OBTENUS	99
I - <u>Introduction</u>	100
II - <u>Principe de la méthode</u>	102
III - <u>Matériel et méthodes</u>	105
A - Réactifs	
1 - Immunoabsorbant ou support	
2 - Les antigènes et leur greffage sur le support	106
3 - Les anticorps	107
4 - Le conjugué	
5 - Le substrat	108
B - Matériel	109
C - Mise au point de la technique	
1 - Détermination de la concentration optimale d'antigène à greffer par cupule et détermination de la dilution optimale	

du conjugué	110
1.1 - Antigène	
1.2 - Conjugué	
1.3 - Anticorps	111
1.4 - Contrôles	
2 - Etude de la sensibilité de la méthode	
IV - <u>Résultats et discussion</u>	112
A - Greffage de l'antigène sur le support polystyrène	
B - Détermination de la dilution antigénique de travail et de la dilution optimale du conjugué	113
C - Etude de la sensibilité de la méthode	113
CONCLUSION	118
ANNEXE TECHNIQUE	121
BIBLIOGRAPHIE	139

AVANT - PROPOS

Le but de notre travail est la mise au point d'une réaction sérologique spécifique pour le diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae*.

Selon les travaux effectués par diverses équipes étrangères, les protéines membranaires confèrent à *M. pneumoniae* son pouvoir pathogène et se présentent donc comme les antigènes de choix pour une réaction sérologique spécifique.

Aussi, avons nous mis au point une méthode d'obtention des membranes de *M. pneumoniae*, sur lesquelles s'effectuera l'extraction des protéines.

INTRODUCTION GENERALE

Au cours de ces dernières années, une meilleure connaissance de la structure de *Mycoplasma-pneumoniae* a permis d'effectuer d'importants progrès dans la compréhension de sa pathogénicité.

Ce microorganisme, dépourvu de paroi, est un modèle cellulaire pratique pour l'étude de la structure et des fonctions de la biomembrane. Son étude antigénique quelque peu délaissée est actuellement reprise à la suite de faux résultats positifs obtenus avec l'haptène glycolipidique, couramment utilisé dans les réactions de dépistage des anticorps anti *M. pneumoniae*.

Le travail que nous présentons est axé sur la séparation et l'extraction d'antigènes membranaires protéiques de *M. pneumoniae* :

- Le premier chapitre fait état de généralités concernant *M. pneumoniae* : position taxonomique, morphologie, structure et pathogénicité. Nous étudions et comparons les diverses méthodes actuelles utilisées pour le diagnostic des infections à *M. pneumoniae*.
- Le second chapitre traite des méthodes permettant d'obtenir des membranes de *M. pneumoniae*. Après avoir comparé plusieurs types de lyse, nous envisageons la récupération des membranes par simple centrifugation différentielle d'un lysat cellulaire obtenu par action des ultrasons.
- Le troisième chapitre est consacré à l'obtention par élution électrophorétique de protéines membranaires après séparation par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium et la vérification de leur antigénicité.

- Le quatrième chapitre consiste en la mise au point d'une technique immunoenzymatique utilisant l'antigène protéique obtenu pour la détection des anticorps anti *M. pneumoniae*.

CHAPITRE

I

Revue générale sur

Mycoplasma pneumoniae

Les mycoplasmes, auparavant dénommés PPLO (Pleuro Pneumonia like organisms) sont les plus petits organismes unicellulaires capables de se multiplier en dehors de cellules hôtes vivantes. Contrairement aux bactéries, ils ne possèdent pas de paroi rigide. Selon le "Bergey's Manual of determinative bacteriology" (1974 : 8^{ième} édition), ils appartiennent à la classe des Mollicutes ("Mollis" = souple, "cutis" = peau). Actuellement, cette classe est subdivisée en 3 familles et 2 genres sont incertains (118).

CLASSE DES MOLLICUTES

. Famille des Mycoplasmataceae :

- genre Mycoplasma
- genre Ureaplasma

. Famille des Acholeplasmataceae :

- genre Acholeplasma

. Famille des Spiroplasmataceae :

- genre Spiroplasma

. Genres à position taxonomique incertaine :

- genre Anaeroplasma
- genre Thermoplasma

I - HISTORIQUE

Le premier mycoplasme, isolé en 1898 par Nocard et Roux, était l'agent de la pneumonie des bovidés, maladie qui a décimé les élevages pendant la seconde moitié du 19^{ième} siècle.

Le premier mycoplasme humain fut isolé en 1937 par Dienes et Edsall à partir du pus d'un abcès de la glande de Bartholin, les souches isolées furent conservées dans les laboratoires sans identification. Ce n'est qu'après l'essor des cultures cellulaires et la découverte de mycoplasmes contaminant 80 % des lignées cellulaires utilisées en virologie que leurs conditions de culture et d'identification furent précisées. Depuis, d'année en année, de nouveaux mollicutes sont découverts aussi bien dans le règne animal (167) que dans le règne végétal (142). D'autre part, il est à noter que les recherches dans le domaine des végétaux, notamment les études sur les spiroplasmales, profitent aux autres règnes du monde vivant, ce besoin d'échanges de connaissances fondamentales entre les divers domaines s'est accentué lors des récents symposium de mycoplasmodologie (22).

En 1944, l'agent d'Eaton (actuellement *Mycoplasma pneumoniae*) responsable chez l'homme de pneumonie atypique primitive fut isolé sur oeuf embryonné. Ce n'est qu'en 1962 qu'un milieu acellulaire pour la croissance de *M. pneumoniae* fut établi par Chanock, Hayflick et Barile (34). Ceci a permis le développement de procédés d'identification et de méthodes sérologiques.

II - ORIGINE

En 1980, Woese et coll (173) ont établi des parentés phylogénétiques entre les mycoplasmes et les bactéries par analyse comparative de leurs oligonucléotides des r RNA 16S. Leurs travaux permettent d'affirmer que les

mycoplasmes ne dérivent pas d'un primitif ancêtre "pré bactérien", ils ont surgi par évolution dégénérative de formes eubactériennes morphologiquement, biologiquement et génétiquement plus complexes : le sous groupe Bacillus-Lactobacillus et Streptococcus des eubactéries gram + capables de sporuler. Les genres Anaeroplasma et Thermoplasma ont une position taxonomique incertaine, la classe des mollicutes est donc un groupe phylogénétiquement incohérent. Ces travaux ont été confirmés par Neimark et London (105) , par étude comparative des enzymes ils ont démontré que les mycoplasmes dérivent d'eubactéries diverses et que notamment le genre Acholeplasma est relié aux Streptocoques des groupes D et N de Lancefield.

Plus récemment, Razin et coll (126) ont démontré, par la technique d'hybridation avec du DNA sonde, une homologie entre une séquence nucléotidique de l'opéron r r n B - r RNA de escherichia Coli et les opérons r RNA de divers mollicutes. D'autre part leurs travaux suggèrent la présence de 1 ou 2 opérons seulement de gènes r RNA dans le génome des mollicutes, ce nombre d'opérons est très inférieur à celui des eubactéries mais rejoint celui trouvé chez les archaebactéries. La petite taille de ce génome réduit considérablement la quantité d'informations génétiques disponibles.

La simplicité de structure liée à cette réduction du génome rend les mycoplasmes incapables de survivre seuls dans la nature, leur faculté d'adhérer aux membranes des cellules hôtes apparaît être associée à la

perte de paroi et les mycoplasmes ont donc acquis par rapport aux espèces d'origine une capacité d'occuper de nouvelles niches écologiques chez les hôtes, ce qui étend les possibilités de pathogénicité des procaryotes chez l'homme.

*

*

*

III - PHYSIOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE DE M. pneumoniae

A - Originalités des mycoplasmes

Le mycoplasme renferme le minimum de structures essentielles pour la croissance et la reproduction : une membrane pour séparer le cytoplasme de l'environnement, des ribosomes pour assembler les protéines cellulaires et une molécule de DNA en double hélice comportant l'information pour cette synthèse des protéines. Leur génome est le plus petit connu actuellement chez les procaryotes, il correspond au génome de *Escherichia coli* divisé par 6 (8).

génomme mycoplasme

0,5 . 10⁹ Daltons

génomme *Escherichia coli*

2,8 . 10⁹ Dalton

Ceci explique les exigences nutritionnelles de *M. pneumoniae*. Ce microorganisme, déficient en "acyl carrier protein" (138), est incapable

de synthétiser les lipides membranaires, aussi la présence de cholestérol et d'acides gras dans les milieux de culture est indispensable.

B - Ultrastructure de M. pneumoniae

Le "coccus" est la morphologie cellulaire de base des cultures de mycoplasmes, le diamètre des plus petits cocci est d'environ 300 nm. Le mode de reproduction s'effectue par simple fission binaire (24). Des formes allongées et fusiformes sont également souvent observées (longueur = 100 μ m, épaisseur = 0,4 μ m), des filaments produisent même des structures branchées mycéliennes d'où le nom de mycoplasma ("Myces" = champignon, plasma" = forme). En 1970, G et P. Biberfeld (17) observent dans la partie effilée des cellules de M. pneumoniae (partie appelée "Tip") une structure en forme de bâtonnet dense aux électrons. Meng et Pfister démontrent en 1980 (99) à l'aide d'anticorps spécifiques anti actine de lapin que ce bâtonnet correspond à un cytosquelette qui confère à M. pneumoniae une mobilité glissante. De plus, les travaux de Neimark (104), qui ont permis d'isoler une protéine "actin like", sont en faveur d'un tel mécanisme moléculaire des changements de forme et des mouvements des mycoplasmes.

C - La membrane de M. pneumoniae

La membrane des mycoplasmes fait l'objet de nombreux travaux depuis quelques années. Une plus grande connaissance des mécanismes impliqués dans les fonctions des membranes des mycoplasmes mènera à une

meilleure appréciation des mollicutes ainsi qu'à une meilleure compréhension de la biomembrane en général.

1 - Composition

La composition générale des membranes des mycoplasmes est la suivante (6, 73, 119, 124) :

- 50 à 60 % de protéines
- 30 à 40 % de lipides
- 1 à 3 % de glucides

Des petites quantités d'acide nucléique et des ribosomes sont associés à la membrane. Les membranes contiennent la totalité des lipides de la cellule.

1.1 - Les lipides

1.1.1 - Teneur générale et organisation

Smith (149, 152) a établi la composition en lipides des membranes de mycoplasmes :

- 30 % de cholestérol
- 65 % de lipides polaires comportant :
 - glycérophospholipides en grande majorité (111)
 - sphingomyéline
 - glycolipides neutres

Les lipides sont organisés en une double couche (45) et la structure de la membrane est comparable au modèle de la "mosaïque fluide" de Singer et Nicolson (147, fig 1 page 14)

1.1.2 - Le cholestérol

Le cholestérol du milieu de culture est incorporé libre et son état reste libre dans la membrane (119). Certains auteurs (139) ont démontré une distribution égale du cholestérol entre les 2 couches de la membrane de *M. gallisepticum*.

L'assimilation du cholestérol fait intervenir des récepteur protéiques (44), une corrélation peut être établie avec les membranes des cellules d'eucaryotes qui présentent des récepteurs de nature protéique (11) pour les LDL (Low Density Lipoprotein).

Il semble jouer un rôle important en stabilisant les phospholipides de la membrane (119).

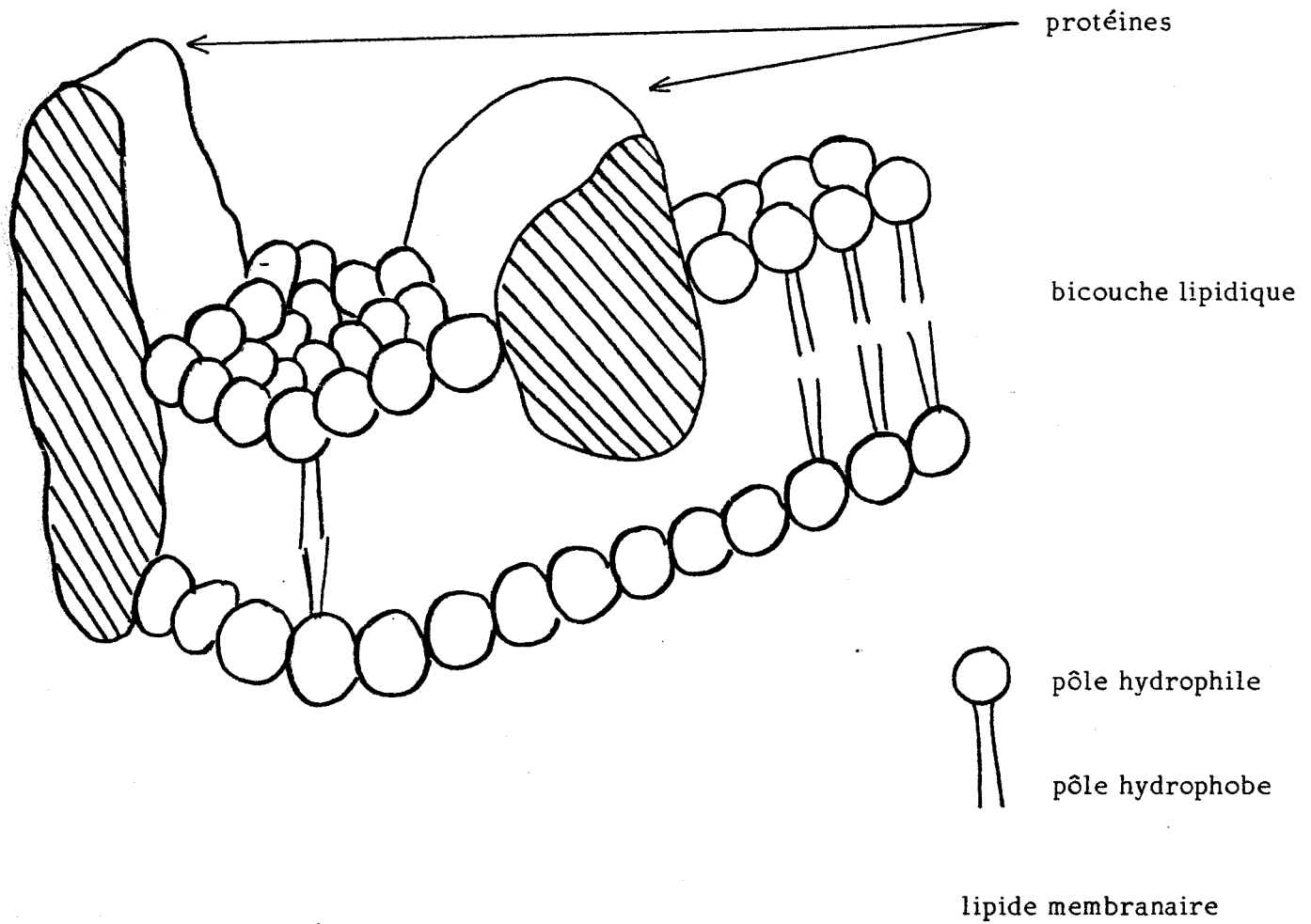


Fig 1 : Modèle en "mosaïque fluide" de la structure membranaire selon Singer et Nicolson (147)

1.1.3 - Les lipides polaires

La membrane de *M. pneumoniae* présente de grandes quantités de glycérophosphatidylcholine ou lécithine (111) dont la teneur représente environ 30 % des lipides polaires. Il y a 50 % d'acide glycérophosphatidique et d'acide glycérodiphosphatidique. Les résidus en sphingomyéline représentent approximativement 10 %. Le reste des lipides polaires est constitué par des glycolipides neutres qui peuvent être utilisés comme haptènes dans les réactions de fixation du complément (111, 160).

La liaison spécifique de certaines lectines aux mycoplasmes suggère que des résidus osidiques sont localisés à la surface (144).

En 1981, Efrati et Rottem (44) ont démontré qu'il existait une certaine relation entre les lipides polaires et le cholestérol : quand le taux de lipides polaires membranaires baisse, l'assimilation du cholestérol décroît.

1.1.4 - Lipides et fluidité membranaire

Les mycoplasmes dépendent du milieu pour leurs acides gras et cholestérol. L'incorporation de ces lipides dans la membrane ne s'effectue pas au hasard, mais elle est sélective selon la qualité et la quantité des lipides. Le contenu lipidique dépend également de la température de croissance et de l'âge de la culture. Par exemple, la composition en acides gras des membranes de mycoplasmes peut contrôler la teneur en cholestérol (88), en d'autres cas un changement de la concentration en cholestérol peut modifier la composition en acides gras (5).

Actuellement, l'incorporation du cholestérol du milieu de culture semble être le facteur majeur pour déterminer l'état de fluidité membranaire à une température donnée (6).

1.2 - Les protéines

1.2.1. - Généralités

Selon la théorie de la "mosaïque fluide", (147, fig 1 page 14), les protéines membranaires qui représentent environ 60 à 70 % des protéines de la cellule (120), flottent dans la bicouche lipidique (75). Il existe :

- des protéines extrinsèques ou périphériques.

Situées à l'extérieur, elles sont déplacées de la membrane par des traitements relativement doux comme les agents chélatants et les solutions de faible force ionique.

- des protéines intrinsèques ou intégrales. Leur déplacement nécessite des traitements drastiques : cassure de la membrane, utilisation de détergents forts étant donné leur association intime avec la membrane.

1.2.2 - Distribution des protéines dans la membrane

Comme pour la membrane des cellules d'eucaryotes, la distribution des protéines dans la bicouche lipidique chez *M. pneumoniae* est asymétrique (78). Il a été démontré chez *Acholeplasma laidlawii* (3, 4), espèce sur laquelle ont été effectués la majorité des travaux portant sur les protéines membranaires des mollicutes (74, 103), que la distribution asymétrique des protéines est affectée par l'âge de la culture, les conditions de culture et le gradient électrochimique à travers la membrane.

1.2.3 - Protéines particulières

Des protéines à fonctions particulières ont été identifiées par diverses équipes de chercheurs ces dernières années.

- En 1977, Neimark (104) isolait une protéine "actin like"

- La même année, Kahane et Brunner (77) démontrent la présence d'une glycoprotéine immunogène.

- Toujours en 1977, P. Hu et coll (69) identifient pour la première fois une protéine membranaire responsable de l'adhésion de *M. pneumoniae* sur les cellules de la trachée : c'est la protéine P₁ de masse moléculaire 165 000 à 195 000 Dalton.

- En 1982, plusieurs auteurs (83) démontrent que cette fonction d'attachement est due à un ensemble de protéines.

- La même année, P. Hu et son équipe (67) localisent la protéine majeure d'attachement P₁ au niveau du "Tip" de *M. pneumoniae*

2 - Fonctions de la membrane

2.1 - Support antigénique

La membrane de *M. pneumoniae* est le support de nombreux déterminants antigéniques. En 1965, Kenny et Grayston (81) extraient un glycolipide membranaire qui est toujours utilisé comme antigène dans la réaction de fixation du complément pour le sérodiagnostic des mycoplasmoses. En 1981, P. Hu et Coll (67) identifient les immunogènes de nature protéique.

2.2 - Activités enzymatiques

Plusieurs activités enzymatiques sont associées à la membrane des mycoplasmes (42, 133, 150)

- l'A T Pase

- la p- nitrophényl phosphatase

La NADH oxydase est cytoplasmique dans le genre *Mycoplasma*, mais membranaire dans le genre *Acholeplasma*.

2.3 - Le transport

Plusieurs modèles de transport transmembranaire ont été décrits pour divers substrats (36). Comme dans le cas de la cellule d'eucaryote, l'A T Pase membranaire joue un rôle important dans ces systèmes de transport. Nous n'allons pas développer ici tous les systèmes connus jusqu'à ce jour, nous ajouterons simplement qu'il existe de nombreuses analogies avec les cellules d'eucaryote.

2.4 - La mobilité

L'étude de l'ultrastructure de *M. pneumoniae* a permis de mettre en évidence une structure particulière dénommée "Tip" (voir page 22) comportant des éléments contractiles (141) qui confèrent à ce microorganisme une mobilité glissante. Néanmoins, la compréhension du mécanisme de contraction des protéines "actin like" chez *M. pneumoniae* nécessite une étude plus élargie et il se peut que l'aspect fonctionnel de ce cytosquelette soit différent de celui de la cellule eucaryotique.

2.5 - L'adhésion

M. pneumoniae, ainsi que d'autres mycoplasmes, adhèrent aux surfaces inertes comme le verre et aux cellules hôtes. C'est la propriété

la plus importante de *M. pneumoniae*, elle explique la pathogénicité de ce microorganisme qui est considéré par certains auteurs (118) comme un parasite de surface.

La majorité des travaux sur l'adhésion sont effectués :

- soit avec des globules rouges (9, 10, 50, 84, 125, 154): étude de l'hémagglutination ou de l'hémadsorption.
- soit avec des cultures cellulaires de cellules épithéliales de la trachée de hamster (69, 83, 115, 154). C'est notamment avec ce type de matériel que les protéines membranaires responsables de l'adhésion ont été identifiées (voir page 22).
- soit avec du verre (50). Cette étude a permis de mettre en évidence la complexité du processus d'attachement. Nous pouvons citer pour exemple le besoin d'énergie de *M. pneumoniae* pour adhérer à une surface en verre.

Les récepteurs des globules rouges et des cellules de la trachée pour *M. pneumoniae* sont des résidus d'acide sialique de sialoglycoprotéine (9, 154). Récemment, L. M. Loomes et Coll (92) ont démontré que le récepteur sialilé est situé sur l'antigène I des hématies. Cette liaison entre le microorganisme et les cellules hôtes apparaît comme une fusion complète des membranes des deux cellules en contact par l'intermédiaire du "Tip" (31, 115, 125), elle induit d'importantes modifications des cellules parasitées.

*

*

*

IV - PATHOGENICITE, IMMUNITE ET INFECTIONS A M. PNEUMONIAE

A - Causes de la pathogénicité

1 - Importance de l'adhésion de M. pneumoniae sur les cellules hôtes

Le manque de paroi permet aux mycoplasmes d'adhérer intimement à la membrane plasmique des cellules hôtes. D. Krause et coll (84) ont isolé des souches de M. pneumoniae mutantes non pathogènes ne présentant pas cette propriété d'attachement. Ces souches étaient déficientes soit en protéine P₁ (10) soit en d'autres protéines lourdes.

2 - Conséquences de l'adhésion de M. pneumoniae sur l'épithélium respiratoire

2.1 - Modifications de la cellule épithéliale ciliée (31)

L'adhésion entraîne des modifications importantes de la cellule épithéliale :

- une désorganisation de la ciliature épithéliale.
- des lésions cellulaires pouvant entraîner une fuite du cytosol, et une mort des cellules parasitées.
- une modification du métabolisme cellulaire, l'inhibition de la synthèse protéique et des acides ribonucléiques(68).

2.2 - Libération de substances toxiques

L'attachement étroit de *M. pneumoniae* aux cellules permet au peroxyde sécrété par le microorganisme d'attaquer les membranes cellulaires des tissus sans être détruit rapidement par la catalase ou la peroxydase présents dans les liquides extracellulaires (25, 154). Si le tissu parasité est représenté par des erythrocytes, le peroxyde alors appelé hémolysine induit l'hémolyse (155). L'attachement de *M. pneumoniae* à la cellule épithéliale de la trachée est schématisé sur la figure 2 (page 22).

2.3 - Développement d'auto anticorps chez l'hôte

L'adhésion du mycoplasme à la membrane cellulaire eucaryotique permet le transfert d'antigènes. L'acquisition d'antigènes de l'hôte par le microorganisme peut aider le parasite à éviter ou à altérer la réponse immunologique de l'hôte, et l'acquisition d'antigènes mycoplasmaïques par la membrane de l'hôte peut développer des réactions autoimmunes qui sont communes dans les pneumonies à *M. pneumoniae* chez l'homme. Les auto-anticorps développés lors des infections sont variés (16) :

- des agglutinines froides (153) dirigées contre les globules rouges.
- des anticorps froids contre les lymphocytes.
- des anticorps fixant le complément contre divers antigènes tissulaires (15) : poumon, tissu nerveux, muscle lisse.

De grandes réserves doivent être faites sur ces affirmations, qui méritent des études plus détaillées. Néanmoins, nous pouvons affirmer

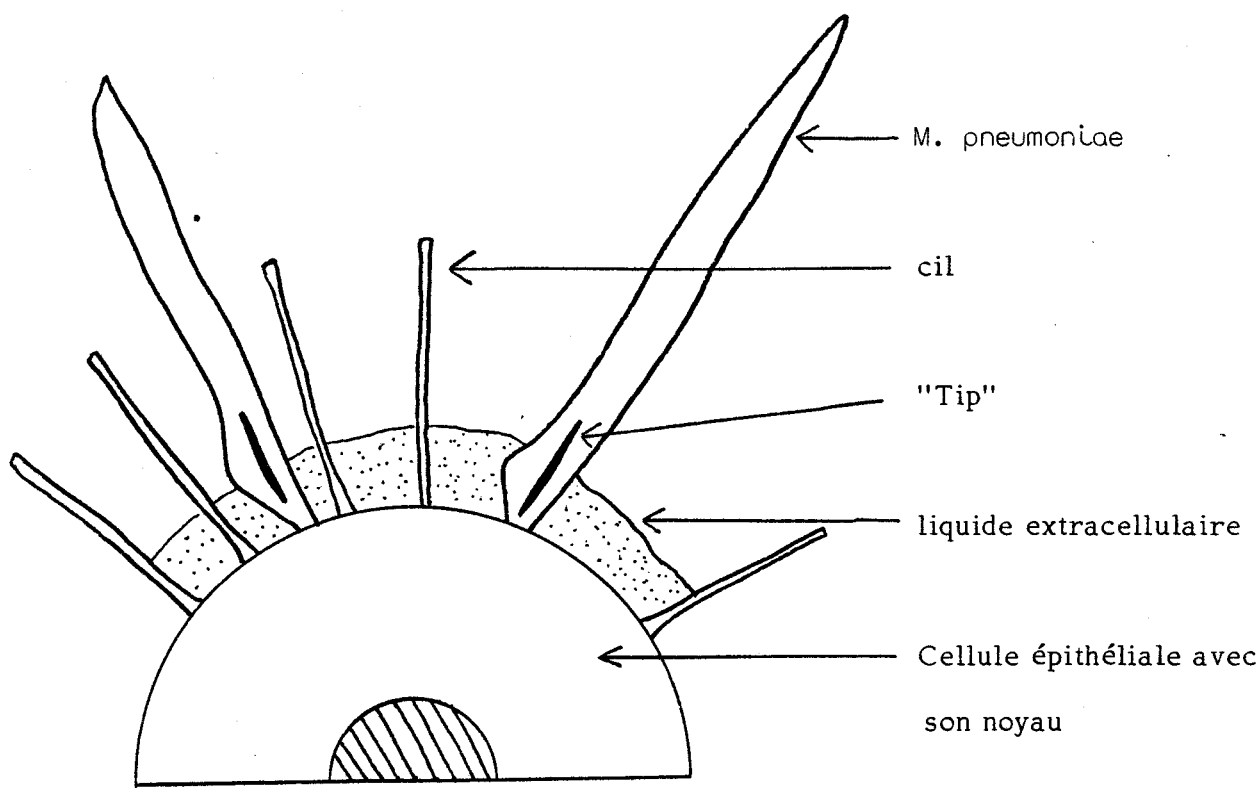


fig 2 : Illustration schématique de l'attachement de *M. pneumoniae*
à la cellule épithéliale ciliée

selon Brunner (25)

que les agglutinines froides apparaissent souvent dans les infections à *M. pneumoniae* (33), et que cette observation s'expliquerait actuellement par deux hypothèses (16) ; ces agglutinines froides seraient le résultat :

- soit d'une réaction croisée entre l'Ag I des érythrocytes et l'Ag présent chez le mycoplasme.

- soit d'une interaction du microorganisme avec la surface des erythrocytes.

B - Immunité induite par *M. pneumoniae*

Il est actuellement admis que la pathogénicité de *M. pneumoniae* peut être considérée comme un équilibre entre l'immunité protective et l'immunité réactive (25, 52).

Immunité protective : elle découle des réponses humorales et cellulaires qui limitent l'abilité du microorganisme à parasiter l'épithélium respiratoire.

réponses humorales : Anticorps locaux, Ig As, Anticorps circulants

réponses cellulaires : Lymphocytes T et B

Immunité réactive : elle découle des réponses humorales et cellulaires qui ne sont pas protectives mais peuvent être préjudiciables à l'hôte.

réponses humorales : Immuns complexes, auto anticorps, anticorps circulants: agglutinines froides. Anticorps locaux: opsonisation, activation des macrophages.

réponses cellulaires : Infiltrats immunoinflammatoires péribronchiques (lym-

phocytes T et B).

C - Les infections à M. pneumoniae

1 - Infection majeure : la pneumonie

M. pneumoniae est l'un des agents étiologiques les plus communs des maladies du tractus respiratoire chez l'homme (25). La majorité des personnes ayant une infection à M. pneumoniae ont une maladie relativement bénigne dépourvue habituellement de complications. Actuellement, les cliniciens et épidémiologistes estiment que 50 % des infections chez les adultes et 20 % chez les enfants sont complètement asymptomatiques. Selon Foy et coll (53, 54, 55), 14 à 20 % des pneumonies sont dues à M. pneumoniae. Ce mycoplasme est l'un des principaux agents responsables de pneumopathies aiguës non bactériennes de type pneumonie atypique primitive qui se rencontrent surtout chez les enfants d'âge scolaire (53).

Aujourd'hui, ces diverses études épidémiologiques sont remises en question en raison de la fausse spécificité de l'haptène glycolipidique utilisé dans les sérodiagnostics (117).

Les infections à M. pneumoniae sévissent principalement dans les régions tempérées, il existe une endémie permanente avec une recrudescence à l'automne et en début d'hiver (76). La transmission se fait uniquement par voie orale et aérienne, mais la contagiosité est faible, les petites épidémies se développent dans le milieu familial et les collectivités (33, 47).

2 - Autres affections respiratoires

Si la pneumopathie à *M. pneumoniae* est l'aspect le plus typique, certaines complications ou localisations à l'appareil respiratoire méritent d'être connues (97, 100, 102, 175) :

- rhinopharyngites,
- laryngites,
- trachéobronchites etc...

3 - Affections satellites extra respiratoires

Le tropisme de cet agent ne se résume pas aux seules affections respiratoires. *M. pneumoniae* est considéré comme responsable de certaines manifestations :

- affections cutanées (60, 110, 145, 161).
- affections musculaires et articulaires (65, 86, 113, 171).
- affections neurologiques (32, 38, 82, 110).
- affections cardiovasculaires (30).
- manifestations hématologiques (agglutinines froides dirigées contre les globules rouges).

La responsabilité directe de *M. pneumoniae* dans ces diverses affections est très discutée, seules des études plus détaillées et plus longues devraient permettre de déterminer son rôle.

4 - Thérapie

4.1 - antibiothérapie

L'évolution des pneumopathies à *M. pneumoniae* est écourtée par l'administration d'un macrolide : erythromycine, oléandomycine ou d'une cycline : tétracycline et ses dérivés (109). Malgré l'efficacité de ces antibiotiques sur les symptômes, le microorganisme est toujours présent dans le tractus respiratoire, il peut être isolé pendant et après l'antibiothérapie (148).

4.2 - Les vaccins

Les essais de vaccination ont débuté dès 1965 selon 2 modalités :

- des vaccins inactivés par le formol (172).

- des vaccins vivants atténués administrés par voie

intranasale : Nous pouvons citer pour exemple le mutant thermosensible ts H43 (109) obtenu par culture de *M. pneumoniae* avec un agent mutagène dérivé de la nitrosoguanidine.

Ces vaccins se sont révélés peu efficaces.

Aussi, plusieurs auteurs espèrent développer un vaccin plus efficace à partir des protéines membranaires et notamment de la protéine P₁ (67) responsables de l'adhésion sur les cellules hôtes. Selon eux, une meilleure connaissance des immunogènes membranaires, plus précisément une extraction des protéines par méthodes de séparation conventionnelle ou par techniques immunoélectrochimiques et une purification par l'utilisation d'anticorps monoclo-

naux permettront de produire des protéines immunogènes appropriés à la production d'un vaccin.

V - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A M. PNEUMONIAE

Comme l'infection à M. pneumoniae n'entraîne pas toujours de manifestations cliniques très évocatrices, le diagnostic biologique est d'un grand intérêt.

La mise en évidence du microorganisme associée à une ascension du titre en anticorps sériques spécifiques permet d'affirmer le diagnostic ; les réactions sérologiques isolées sont d'interprétation plus délicate et il en conviendra d'en suivre l'évolution.

A - Diagnostic direct, isolement et identification de M. pneumoniae

1 - Milieux utilisés

Actuellement deux milieux synthétiques permettent l'isolement de M. pneumoniae à partir des expectorations :

- le milieu de Hayflick (34, 64) : premier milieu acellulaire permettant la croissance du microorganisme, et commercialisé en France. (Voire composition page 43).

- le milieu SP4, mis au point pour les spiroplasmes en 1977 (169), non commercialisé en France jusqu'ici.

L'utilisation du milieu SP4 permet un taux d'isolements de *M. pneumoniae* à partir de produits biologiques supérieur à celui obtenu par culture (158) sur milieu de Hayflick. Cette amélioration peut avoir une incidence importante sur les connaissances épidémiologiques actuelles des infections à *M. pneumoniae*. Par contre, toute souche de laboratoire pousse aussi bien dans l'un que dans l'autre milieu de culture. Le temps d'incubation est le même pour les 2 milieux.

2 - Isolement de *M. pneumoniae*

2.1 - Les prélèvements

M. pneumoniae ayant une grande affinité pour la membrane des cellules de la trachée, il est impératif d'obtenir un maximum de cellules infectées. Ainsi, l'expectoration du matin, le brossage endobronchique ou le lavage alvéolaire (lorsqu'il est praticable) sont des méthodes de prélèvements supérieurs à un écouvillonnage de gorge.

2.2 - Inoculation et conditions de culture

S'il n'est pas possible de cultiver les mycoplasmes immédiatement, il est nécessaire de recourir à un milieu de transport favorable à leur conservation. Les milieux de transport, qui peuvent être conservés à -70° C pour une culture ultérieure, sont des milieux tamponnés contenant 500 U de pénicilline par ml pour éviter la prolifération bactérienne.

Les prélèvements sont inoculés sur bouillons et géloses. L'incubation s'effectue à 37° C en aérobose ou en atmosphère de CO_2 à 5 % dans l'azote ou l'hydrogène. Il faut veiller soigneusement au maintien d'une atmosphère

humide, les mycoplasmes étant très sensibles à la dessiccation.

L'isolement est long et réclame une certaine expérience (12, 20, 110)
M. pneumoniae cultive lentement, les cultures sont gardées 4 semaines avant d'être considérées négatives.

2.3 - Identification

2.3.1 - La morphologie des colonies

Les colonies sont recherchées à partir du 5^{ème} jour à un grossissement de x 100 à travers le milieu de culture dans les boîtes inversées sur la platine d'un microscope ordinaire. Les colonies de M. pneumoniae ont de 10 à 500 μ de diamètre ; en vieillissant elles prennent un aspect en "oeuf sur le plat" très caractéristique (12), aspect très accentué après coloration de Dienes.

2.3.2 - Caractères biochimiques

De nombreuses propriétés biochimiques permettent de différencier M. pneumoniae des autres espèces de mycoplasmes :

- fermentation du glucose : dès que l'acidification du milieu apparaît, il faut repiquer si l'on ne veut pas perdre la souche.
- présence d'une hémolysine soluble de type β (155)
- caractère hémadsorbant (62)
- réduction en aérobiose du 2, 3, 5 triphényl tétrazolium (174).

2.3.3 - Caractères antigéniques

Diverses techniques immunologiques permettent d'identifier les souches isolées.

2.3.3.1 - L'inhibition de croissance : GI ("growth inhibition")

La croissance de *M. pneumoniae* est inhibée par l'anticorps spécifique dont il provoque la formation. Cette inhibition est habituellement révélée par la technique des disques de papier filtre imprégné de sérums immuns déposés sur les géloses (39), nous pouvons apprécier une zone d'inhibition autour d'un des disques.

2.3.3.2 - L'epifluorescence

L'identification de *M. pneumoniae* peut également s'effectuer par l'utilisation d'immunsérum spécifique de lapin et d'immunsérum antiglobuline de lapin fluorescent (35, 163) ; à cet effet Clark et Coll (37) ont établi une méthode de transfert des colonies de mycoplasmes sur une surface en verre sur laquelle nous effectuons la réaction. L'intérêt de cette réaction réside dans sa rapidité, en effet les tests d'inhibition de croissance ont le désavantage d'être longs à cause de la croissance lente de ces microorganismes.

La fréquence des isollements de *M. pneumoniae* est très basse (20, 21) aussi le diagnostic sérologique voit son importance agrandie. D'autre part l'isolement et l'identification d'un mycoplasme à partir d'un produit pathologique ne peut suffire à établir une relation de cause à effet entre ce mycoplasme et le syndrome observé. Il est indispensable de prouver son rôle antigénique en démontrant l'élaboration d'anticorps spécifiques humoraux ou de cellules immunocompétentes.

B - Le diagnostic sérologique

Le titrage des anticorps sériques spécifiques anti *M. pneumoniae* peut être réalisé par diverses techniques. Leur recherche doit, pour être considérée comme positive, montrer un taux d'anticorps spécifiques élevé ou mieux, leur ascension significative à 2 prélèvements pratiqués à 2 ou 3 semaines d'intervalle, correspondant à un stade précoce et à un stade tardif de la maladie.

1 - Techniques sérologiques classiques

1.1 - L'immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte fut la 1ère méthode sérologique utilisée par C. Lu en 1957 (91), l'antigène était constitué par des coupes d'embryon de poulet infecté (163). D'autres antigènes lui sont préférés actuellement : des colonies de *M. pneumoniae* fixées sur les lames de microscope (90). Mais les difficultés de cette technique limitent son application courante.

1.2 - L'hémagglutination indirecte et l'inhibition de l'hémagglutinine de *M. pneumoniae*

Ces 2 techniques ne sont pas pratiquées couramment. L'hémagglutination est une méthode très sensible mais relativement peu spécifique, l'antigène consiste en un culot de cellules de *M. pneumoniae* ayant subi l'action des ultrasons (163).

Feldman et Suhs ont démontré en 1966 (48) que *M. pneumoniae* vivant a la propriété d'une hémagglutinine, cette propriété est utilisée pour la mesure des anticorps (41).

1.3 - Les réactions d'inhibition de croissance et d'inhibition métabolique

L'inhibition de croissance de *M. pneumoniae* (GI) peut être appliquée à la recherche d'anticorps sériques à l'aide d'une souche de référence connue (72). Cependant, son utilisation quantitative est délicate et sa lecture difficile. Aussi, préfère-t-on pour cet usage les réactions d'inhibition métaboliques. Deux propriétés métaboliques de *M. pneumoniae* sont utilisées : la fermentation du glucose ou la réduction du triphényltétrazolium. Nous recherchons donc si le sérum du patient renferme des anticorps susceptibles d'inhiber la fermentation du glucose (165) ou la réduction du triphényltétrazolium (73) par une souche connue de *M. pneumoniae* et jusqu'à quelle dilution du sérum cette inhibition a lieu.

Ces réactions nécessitent de nombreuses précautions et leur lecture peut être faussée par l'existence concomitante d'un traitement antibiotique chez le malade, le sérum renfermant alors des antibiotiques inhibant le développement de *M. pneumoniae* (151). Ces réactions sont sensibles et spécifiques mais beaucoup trop longues à réaliser.

1.4 - La réaction de fixation du complément CFT

C'est la réaction la plus courante, ce n'est pas la plus sensible. L'antigène habituellement utilisé est l'haptène glycolipidique obtenu à partir de membranes de *M. pneumoniae* par extraction au chloroforme méthanol (80) il a fait l'objet de nombreux travaux (111, 127, 128). Schiefer et coll (144) ont démontré par l'utilisation de lectines que la partie glycosidique composée de

galactose et de glucose était localisée à la surface de la membrane. De nombreuses études épidémiologiques ont été effectuées à l'aide de la réaction CFT, notamment dans les pays anglo-saxons et nordiques (47, 55, 156). Encore actuellement, c'est la méthode de routine pour le sérodiagnostic des infections à *M. pneumoniae* (129, 166). En 1980, E. B. Roach et coll (131) ont même développé une technique de CFT pour la mesure des Ig M. en vue de diagnostiquer les infections récentes.

Il y a quelques années, certains auteurs (25, 28, 58) se sont rendus compte que cet haptène glycolipidique présentait une communauté antigénique avec les glycolipides de certains végétaux et d'autres microorganismes; d'ailleurs déjà en 1969 Placket et coll (111) en étudiant la séparation et l'identification des lipides sérologiquement actifs de *M. pneumoniae* prévoient l'existence de telles réactions croisées. De fausses réactions positives peuvent être également observées chez les sujets atteints de pancréatite (87).

1.5 - Autres réactions utilisées

1.5.1 - Les agglutinines froides

Le petit nombre de patients qui présentent une élévation significative en agglutinines froides et le grand nombre de fausses réactions positives suggèrent que ce procédé est de valeur limitée dans le diagnostic biologique des infections à *M. pneumoniae*.

1.5.2 - Le test mycoplasmacidal : MCT ("Mycoplasmacidal Test")

L'action combinée des anticorps et du complément produisent des lé-

sions dans la membrane de *M. pneumoniae* qui conduisent à la mort du microorganisme. Brunner et coll (26) ont utilisé cette propriété mise en évidence par Gale et Kenny (56) afin de développer un test sérologique reproductible. Ils ont démontré la grande sensibilité de ce test comparativement aux réactions de CFT et d'inhibition métabolique. Mais cette technique a le désavantage d'être longue et difficile à réaliser étant donné la croissance lente du microorganisme.

1.5.3 - La contre immunoélectrophorèse : CIEP

La contre immunoélectrophorèse peut s'appliquer à la recherche des anticorps dans les sérums (57). Son principe consiste en la formation d'un précipité Antigène - Anticorps après migration électrophorétique, les sérums étant placés du côté anodique et les antigènes du côté cathodique. Cette technique a le désavantage d'être seulement une méthode qualitative et de présenter une sensibilité beaucoup plus basse que celle de la réaction de CFT. Tout sérum présentant une réaction positive doit être titré selon une méthode beaucoup plus sensible.

2 - Nouvelles techniques sérologiques

A la suite des problèmes présentés par les méthodes décrites précédemment, notamment la faible sensibilité de la réaction de CFT et le manque de spécificité de l'haptène glycolipidique des nouvelles techniques utilisant des antigènes de nature différente se sont développées.

2.1 - La radioimmunologie

L'utilisation des radioisotopes a permis à certains auteurs de développer des techniques de dépistage des anticorps anti *M. pneumoniae* très spécifiques et très sensibles (27, 28) et des méthodes simplifiées de

détection des Ig M. Malgré sa simplicité, ce procédé ne peut pas être développé pour le diagnostic de laboratoire courant étant donné ses contraintes matérielles et administratives.

2.2 - Enzyme - Linked - Immunosorbent - assay : ELISA

Cette méthode, comme la précédente, est sensible et simple. Contrairement à la radioimmunologie elle a la chance de pouvoir s'établir dans tout laboratoire de dépistage. Aujourd'hui, les auteurs sont tous d'accord pour affirmer que ce procédé remplacera dans les années à venir la réaction de CFT. Comme l'haptène glycolipidique décrit antérieurement donne de fausses réactions positives (25, 27, 87), des nouveaux antigènes ont été utilisés :

- Räsänen et coll (117) ont testé une fraction protéique brute de *M. pneumoniae* obtenue après traitement au tween-éther. Une étude comparative (43) entre la réaction ELISA avec cet antigène récemment commercialisé (Orion-diagnostica) et la réaction de CFT utilisant l'haptène glycolipidique a permis d'admettre la grande supériorité de ELISA.

- Busolo et coll (29) ont testé une suspension de cellules de *M. pneumoniae*. C'est avec ce procédé que fut démontré la présence courante de facteur rhumatoïde dans les infections à *M. pneumoniae* (101) lors du dépistage des Ig M. Ce type d'antigène cellulaire n'est pas commercialisé étant donné son manque de stabilité.

De toute ces préparations antigéniques aucune ne présente un grand degré de pureté. La présence de déterminants antigéniques provenant

du milieu de culture n'a jamais été vérifié, malgré les propriétés adsorbantes de *M. pneumoniae* (118)

Une séparation et une purification des protéines membranaires permettraient donc :

- une amélioration du diagnostic sérologique
- d'envisager la production d'un nouveau vaccin
- une meilleure compréhension de la réponse immune.

Mais l'extraction des protéines doit s'effectuer sur un matériel bien défini : la membrane de *M. pneumoniae*. Aussi, décrivons nous d'abord la méthode d'obtention de membranes avant d'étudier l'isolement des protéines et leur utilisation en techniques sérologiques.

*

*

*

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE

II

Préparation des membranes

de *Mycoplasma pneumoniae*

I - INTRODUCTION

Deux raisons essentielles font que la membrane des mycoplasmes est un des meilleurs systèmes pour l'étude de la biomembrane (6) :

- la facilité d'isolement de la membrane par l'absence d'organites et de paroi.

- la possibilité de contrôler la composition de la membrane par modification des constituants du milieu de culture. *M. pneumoniae* est très exigeant, il absorbe particulièrement les acides gras et le cholestérol du milieu.

Malgré les nombreuses études effectuées sur la lyse des mollicutes (121, 122, 123, 146), la sensibilité de *M. pneumoniae* aux diverses méthodes de lyse reste actuellement peu connue et nous sommes donc contraints de comparer plusieurs procédés dans le but d'obtenir des membranes intactes sur lesquelles s'effectuera une extraction des antigènes désirés. Deux méthodes de préparation des membranes de *M. pneumoniae* ont été rapportées jusqu'à ce jour :

- Obtention des membranes après exposition des mycoplasmes aux ultrasons par Banai et coll (9).

- Isolement des membranes par lyse osmotique après contact au glycérol par Kahane et Brunner (77).

Non seulement la sensibilité des mycoplasmes aux diverses méthodes de lyse varie selon les espèces (121, 123) mais elle varie également selon

les souches. En effet, la souche *M. pneumoniae* 65.2053 utilisée par J.D. Pollack et coll (112) est sensible à la lyse osmotique, alors que la souche *M. pneumoniae* FH que nous utilisons est résistante (9).

D'autres procédés également considérés comme méthodes "douces" au même titre que la lyse osmotique ont été utilisés pour lyser les souches résistantes à la lyse osmotique :

- La digitonine, en se fixant au cholestérol des membranes, induit la lyse du microorganisme (136). Mais la digitonine est retenue dans la membrane et peut donc nuire à toute analyse ultérieure des constituants membranaires.

- Un précontact des cellules de mycoplasme avec du glycérol augmente la sensibilité à la lyse osmotique (140), un certain nombre de mycoplasmes résistants à la lyse osmotique deviennent sensibles par cette méthode (77, 79).

Nous vérifions la résistance de la souche *M. pneumoniae* FH à la lyse osmotique et nous étudierons une lyse osmotique précédée d'un précontact avec du glycérol.

Une autre méthode dite "douce" nous semble appropriée pour ce microorganisme : une lyse enzymatique. En raison de la richesse particulière en lipides (124) et en phospholipides (111) de la membrane, nous allons étudier l'action de 2 enzymes lipolytiques : la lipase et la phospholipase A₂. La lyse par action de la lipase s'est révélée active sur diverses espèces de

mycoplasmes (123), mais jusqu'à ce jour aucun essai n'a été effectué sur *M. pneumoniae*. Effrati et coll (44), en étudiant au moyen de la phospholipase A₂ le rôle des lipides dans l'assimilation du cholestérol par diverses espèces de mycoplasmes, ont démontré que 50 % des lipides membranaires étaient hydrolysés. Une hydrolyse aussi importante des lipides membranaires pourrait induire la lyse de *M. pneumoniae*.

La lyse aux ultrasons considérées comme "drastique" (6,119, 146) brise les cellules en des fragments très petits difficiles à récupérer par ultracentrifugation. Mais cette méthode a l'avantage d'utiliser un paramètre variable en modifiant les temps d'exposition aux ultrasons, il est peut-être possible d'obtenir des membranes de *M. pneumoniae* plus ou moins endommagées mais de qualité assez bonne pour une étude antigénique.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Culture

1 - Souche

1.1 - origine

Nous utilisons la souche *M. pneumoniae* FH isolée par Liu en 1957 (91). Elle nous fut aimablement offerte par Madame Krembel de l'Institut Pasteur de Lille. (s ouche de laboratoire provenant du département de virologie de l'Institut Pasteur de Paris : Madame Bonissol).

1.2 - Clonage et stockage de la souche

Afin de maintenir sa propagation, la souche futensemencée dans un milieu liquide contenant du glucose et du rouge de phénol. La présence de glucose stimule la croissance, mais l'acidification produite diminue la vitalité des microorganismes. Ainsi, le milieu glucosé permet d'apprécier la croissance de *M. pneumoniae* mais ne doit pas être utilisé pour la conservation des souches par congélation. Dès que le bouillon devient légèrement orangé, nous repiquons sur un milieu gélosé ; après 10 jours d'incubation à 37° C l'une des colonies observées au microscope est repiquée en prélevant le bloc d'agar la renfermant et en l'écrasant en milieu liquide. Cette opération, répétée 3 fois, permet de cloner la souche. Celle-ci peut ensuite être conservée congelée à -40° C en aliquots de milieu liquide non glucosé.

Tout au long de nos travaux, la culture de chaque souche congelée en bouillon glucosé devenait légèrement orangée exactement après 7 jours d'incubation à 37° C ; cette suspension servait à incuber les flacons de culture.

2 - Conditions de culture

2.1 - Milieu utilisé

Nous utilisons le milieu de Hayflick (34).

2.1.1 - milieu de base :

- peptone bactériologique..... 10 g
- extrait de viande..... 10 g
- NaCl..... 5 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g
- Eau bidistillée Q.S.P..... 1 litre

2.2.2 - supplément d'enrichissement (en concentrations finales)

- sérum de poulain..... 20 % V/V
- extrait de levure..... 10 %
- pénicilline..... 1000 UI/ml
- acétate de thallium..... 1/2000
- glucose..... 1 %
- rouge de phénol..... 0,0006 % P/V

Le sérum de poulain apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié, de l'urée. Certains auteurs utilisent du sérum du cheval, d'autres préconisent du sérum de cheval privé de gamma-globulines. Le sérum de poulain doit être conservé congelé.

L'extrait de levure est une solution à 25 % (P/V), cet autolysat doit être fraîchement préparé à partir de levure de boulanger. La levure pure et sèche est suspendue à 25 % dans de l'eau distillée et lysée à chaud. L'extrait est clarifié par centrifugation et filtration puis stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes.

Afin d'éviter la prolifération des contaminants, de la pénicilline et de l'acétate de thallium qui est hautement bactériostatique pour les microorganismes aérobies, sporulés et les bactéries gram - sont incorporés dans le milieu.

L'adjonction du glucose dans les milieux favorise la culture des mycoplasmes fermentaires comme *M. pneumoniae*.

2.2 - Incubation

Nous répartissons 300 ml de ce milieu dans des flacons de 500 ml contenant des petites billes de verre de 4 mm de diamètre qui représentent le quart du volume du flacon, ces billes augmentent la surface d'adhésion des microorganismes et permettent donc une élévation du rendement de culture. Les milieux sont inoculés à l'aide de 0,3 ml d'une suspension de mycoplasmes contenant environ 10^8 CFU/ml (CFU = colony forming units). L'incubation s'effectue à 37° C en aérobiose jusqu'au début du virage du rouge de phénol soit pendant 7 jours.

Ces conditions de culture sont impératives à 2 titres :

- la composition en lipides de la membrane varie selon le milieu (119), à cette variation peut correspondre une modification de la réponse aux méthodes

de lyse ; aussi chaque produit du milieu de culture devra provenir du même lot d'origine :

par exemple : sérum de poulain n° 13 811.

(Institut Pasteur Production)

Le temps d'incubation sera rigoureusement toujours le même : 7 jours après l'ensemencement. La phase logarithmique de croissance n'étant pas définie chez ces microorganismes à croissance lente (119), nous arrêtons la croissance dès le virage du rouge de phénol. Le contenu lipidique de la membrane dépend également de l'âge de la culture (6). Rottem et Greenberg (134) ont démontré en 1975 que le taux de lipides membranaires décroît avec l'âge, ce qui pourrait modifier les propriétés physiques des cellules de *M. pneumoniae*.

B - Obtention des cellules de mycoplasme

1 - Vérification des cultures avant centrifugation

Les cultures, malgré la présence de substances inhibitrices telle l'acétate de thallium, peuvent comporter des microorganismes autres que *M. pneumoniae*. Aussi avant de récupérer les mycoplasmes, nous vérifions le contenu des milieux de culture de 3 façons.

1.1 - Observation directe

Après homogénéisation par simple agitation des milieux qui, malgré

la croissance de *M. pneumoniae* doivent rester limpides, nous prélevons stérilement une goutte à la pipette Pasteur que nous étalons sur une lame porte objets. Après fixation et coloration de gram, nous observons au microscope optique (grossissement x 1000) l'existence éventuelle de bactéries aérobies ou anaérobies et même de levures.

1.2 - Repiquage sur milieu usuel

Nous étalons un peu de bouillon sur une gélose chocolat afin de dépister toute présence de bactérie aérobie après 48 H d'incubation à 37° C.

1.3 - Repiquage sur gélose pour *M. pneumoniae*

20 µl de milieu de culture sont étalés uniformément sur toute la surface d'une petite boîte de pétri (diamètre = 50 mm) au moyen d'un étaleur en verre. Après 7 jours d'incubation nous observons au microscope optique (grossissement x 100) les boîtes afin de vérifier la présence de *M. pneumoniae* dans les flacons de culture. Nous comptons le nombre de colonies par ml soit le CFU/ml (colony forming unit par ml) selon la méthode d'Albers et Fletcher (1) que nous avons modifiée (voire annexe technique page 122)

2 - Centrifugation des milieux de culture

Après homogénéisation par simple agitation, les milieux de culture sont centrifugés à 12 000 g pendant 45 minutes dans une centrifugeuse Sorvall superspeed RC₂ "Automatic refrigerated centrifuge" rotor GSA.

3 - Lavage et stockage des culots cellulaires

Les culots cellulaires correspondant à 500 ml de milieu de culture sont repris par 30 ml de tampon phosphate salin 0,1 M pH 7,2 (PBS) :

- $\text{PO}_4 \text{ Na}_2 \text{ H}, 12 \text{ H}_2 \text{ O}$ 27 g
- $\text{PO}_4 \text{ Na H}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g
- NaCl..... 8 g
- Eau distillée.....QSP..... 1 litre

Ils sont fortement homogénéisés au vortex et subissent une centrifugation à 11 000 g pendant 10 minutes (rotor Sorvall SS 34). Cette opération est renouvelée 7 fois, une exposition de 10 secondes aux ultrasons à une longueur d'onde de 5μ dans un désintégrateur à ultrasons (MSE ultrasonic désintégrateur 150 W) est effectuée après le 3^{ème} lavage afin de dissocier les amas cellulaires. Ce nombre de 7 lavages successifs fut établi lors d'expériences antérieures par mesure de la teneur en protéines du surnageant, notre souci étant d'éviter la présence de protéines solubles du milieu de culture dans les culots cellulaires. Les culots lavés sont repris dans du tampon PBS à 0,1 % d'azide (P/V) et stockés à -40°C . La préparation de la suspension cellulaire de *M. pneumoniae* est schématisée sur la figure 3.

C - lyse de *M. pneumoniae*

L'obtention des membranes nécessite une étude préalable de la lyse de *M. pneumoniae*.

1 - Evaluation du degré de lyse

Le degré de lyse sera mesuré par l'évolution de la turbidité ou DO (densité optique) à 500 nm (121, 123) au moyen d'un spectrophotomètre : Zeiss MKII en cuve de 1 cm de chemin optique. Les zéro sont effectués sur le tampon destiné à recevoir les cellules de *M. pneumoniae*. Nous avons essayé d'évaluer le degré de lyse par néphélométrie laser (Nephelo laser Hyland PDQ), mais cette technique s'est révélée beaucoup trop sensible. Les suspensions cellulaires sont très hétérogènes, il existe des amas cellulaires de tailles variables, aussi la dispersion de la lumière est très instable.

2 - Lyse osmotique

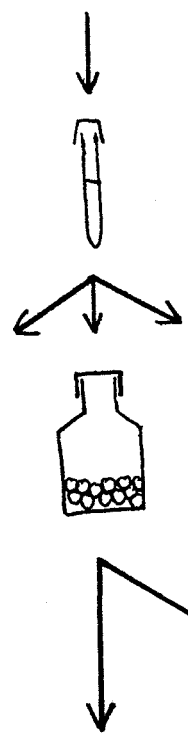
L'étude de la lyse de *M. pneumoniae* dans un milieu hypotonique s'effectue au moyen d'une série de dilutions en NaCl. A cet effet, les culots cellulaires seront préparés selon la méthode de Rodwell et coll (132) que nous avons légèrement modifiée : les cellules conservées dans du tampon PBS sont lavées 2 fois avec du tampon Tris :

- 0,05 M.....Tris (Tris (hydroxyméthyl)aminométhane)
- 0,035 M..... HCl
- pH 7,3

et suspendues dans ce même tampon. Cette préparation ne comporte aucune trace de magnésium ou autre cation di ou multivalent qui protègent les cellules de la lyse osmotique (119). On ajoute 0,1 ml de cette suspension cellulaire à 9 tubes en verre de 6 ml contenant 5 ml de tampon Tris à diverses concentrations en NaCl (Tableau 1) Les dilutions ainsi préparées présentent une DO égale à 0,450. Après 30 minutes d'incubation à 37° C (122) les différentes suspensions sont lues au spectrophotomètre.

Souche conservée au congélateur (- 40° C)

M. pneumoniae FH



Reprise de la souche par un tube de bouillon glucosé 7 jours d'incubation à 37° C.

ensemencement de flacons de 300 ml de milieu.

7 jours d'incubation à 37° C.

Vérification du contenu :

- recherche d'une contamination éventuelle
- calcul du nombre de CFU/ml

Centrifugation 40 minutes à 12 000 g



3 lavages successifs

action des ultrasons (10 secondes)

4 lavages successifs

culot repris par du tampon PBS 0,1 % azidé

Suspension cellulaire

Fig 3 : Schéma de la préparation d'une suspension cellulaire de M. pneumoniae

(:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
(numéro du	:	1	:	2	:	3	:	4	:	5	:	6	:
(tube	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
(:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
(concentration	:	1,25 M	:	0,125 M	:	12,5 mM	:	1,25 mM	:	125 μ M	:	12,5 μ M	:
(en NaCl	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
(:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

Tableau 1 : Concentration en NaCl utilisées pour l'étude de la lyse osmotique de *M. pneumoniae* FH

3 - Lyse osmotique précédée d'un précontact au glycérol

Elle s'effectue en 2 temps :

- 1er temps : précontact des cellules au glycérol :

Les cellules de *M. pneumoniae* sont mises en contact avec du glycérol selon le procédé de Rottem et coll (140). 1 ml de suspension cellulaire est mélangé avec 5 ml d'une solution de glycérol 2M.

- 2nd temps : lyse osmotique dans l'eau distillée. Après une incubation de 10 minutes à 37° C et centrifugation on ajoute immédiatement :

- 0,1 ml de ces cellules à 5 ml d'eau distillée à 4° C.

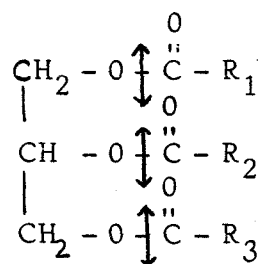
- 0,1 ml de ces cellules à 5 ml de glycérol 2M à 4° C.

Les variations turbidimétriques de ces 2 préparations sont ensuite comparées.

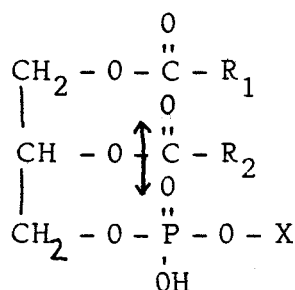
4 - Lyse enzymatique

4.1- Principes d'action des 2 enzymes lipolytiques

La lipase hydrolyse les glycérides en coupant les liaisons esters :



La phospholipase A₂ hydrolyse les lécithines et les acides glycéro mono ou diphosphatidiques en coupant la liaison ester au niveau du carbone central du glycérol.



si X = choline : lécithine

si X = H : acide glycéromonophosphatidique.

Comme les glycérides peuvent masquer les lécithines et réciproquement et que les composants lipidiques sont situés plus ou moins à l'intérieur des membranes (14), les 2 enzymes sont utilisées séparément et simultanément :

- action de la lipase seule
- action de la phospholipase A₂ seule
- action simultanée des 2 enzymes
- action de la lipase suivie de celle de la phospholipase A₂
- action de la phospholipase A₂ suivie de celle de la lipase.

4.2 - Enzymes utilisés

Les 2 enzymes ont une activité optimale à des pH différents, nous

devons donc établir des conditions d'expériences très strictes.

4.2.1 - Lipase type VII (Sigma Chemical Co) :

Lipase de *Candida cylindracea*. 470 unités/mg de solide. Comme il y a 5 g de solide pour 1 g de protéines nous avons 2350 unités/mg de protéines
 Définition de l'unité : 1 unité hydrolyse 1 microéquivalent d'acide gras d'un triglycéride en 1 heure à pH 7,7 à 37° C.

4.2.2 - Phospholipase A₂ (Sigma Chemical Co) :

Phospholipase de venin d'abeille 1500 unité/mg de protéines à pH 8,5 et à 37° C. Définition de l'unité : Une unité hydrolyse 1 micromole de L α phosphatidylcholine en L α lysophosphatidylcholine et un acide gras par minute à la température et au pH appropriés.

4.3 - Action de la lipase seule

0,1 g de lipase sont repris par 100 ml de tampon phosphate 0,01M pH 7,7

- PO₄ Na₂ H, 12 H₂O..... 13,5 g
- PO₄ Na H₂, 2H₂O..... 2 g
- CaCl₂..... 0,22 g
- Mg Cl₂..... 0,19 g
- Eau distillée.....QSP..... 1 litre

A partir de cette solution mère à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nous effectuons une série de dilutions de 2 en 2 (Tableau 2). Chaque tube contenant 2 ml de solution de lipase reçoit 0,7 ml de suspension cellulaire. Au temps t₀ la DO de chaque tube est égale à 0,450. Après 1 heure 30 minute d'incubation à 37° C, nous reprenons les DO de tous les tubes.

Remarque : Une concentration en lipase supérieure à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ interfère dans la mesure de la DO.

4.4 - Action de la phospholipase A₂ seule

1 mg de phospholipase A₂ est repris par 15 ml d'eau distillée stérile, cette solution mère à 100 unités/ml est partagée en aliquots qui sont stockés à -40° C.

Tableau 2 : Concentrations en lipase utilisées pour l'étude de la lyse enzymatique de *M. pneumoniae*.

(numéro du	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(tube	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(concentra-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(tion de li-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(pase en	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(μg/ml	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
(:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	0	0,9	1,8	3,6	7,5	15	31	60,25	125	250	500	1000	

Tableau 3 : Concentrations en phospholipase A₂ utilisées pour l'étude de
la lyse enzymatique de *M. pneumoniae*

numéro du tube	Volume de solution mère de phospholipase A ₂ ajoutée en μ l	Teneur en phospholipase de chaque tube en unités	Concentration en phospholipase, en unité, par mg de protéine
1	0	0	0
2	1	0,1	0,2
3	5	0,5	1
4	10	1	2
5	15	1,5	3
6	20	2	4
7	25	2,5	5
8	30	3	6
9	35	3,5	7

La suspension cellulaire de *M. pneumoniae* est lavée 2 fois dans le tampon préconisé par Bevers et coll (13) :

- Tris..... 6 g
- Mg Cl₂..... 1,9 g
- CaCl₂..... 0,55 g
- NaCl..... 5,8 g
- Eau distillée.....QSP..... 1 litre
- pH 8,5

Le culot est repris par le même tampon pour donner une solution dont la DO est égale à 0,450. A une série de tubes contenant chacun 4 ml de cette préparation, nous ajoutons diverses quantités de la solution mère de phospholipase A₂ (Tableau 3). La concentration en enzyme est donnée en unités par mg de protéines, la teneur en protéines de la suspension cellulaire étant mesurée selon la méthode de Lowry modifiée par Markwell et coll (98, voir annexe technique page 124), cette teneur en protéines est de 0,125 g/litre soit 0,5 mg de protéines par tube. Après 2 heures d'incubation à 37° C, nous mesurons la DO de tous les échantillons. La réaction enzymatique peut être arrêtée par l'addition d'un excès d'EDTA comme le préconisent certains auteurs (13, 44).

4.5 - Action simultanée de la lipase et de la phospholipase A₂

Pour ces manipulations, nous faisons varier la teneur en phospholipase A₂ en utilisant une concentration moyenne fixe en lipase (250µg de lipase/ml). Aux tubes numérotés de 1 à 9 (Tableau 3) nous ajoutons 5µl d'une solution à 200µg/µl de lipase. Comme précédemment, les préparations présentent au temps t₀ une DO égale à 0,450. Après 2 heures d'incubation à 37° C, les variations de la turbidité sont mesurées au spectrophomètre.

4.6 - Actions séparées de la lipase et de la phospholipase A₂

4.6.1 - Action de la lipase suivie de celle de la phospholipase A₂ :

40 ml de suspension cellulaire contenant 250 μ g de lipase/ml et présentant une DO égale à 0,450 sont préparés selon le protocole décrit pour la lyse par la lipase seule (page 52). Après 1 heure 30 minutes d'incubation à 37° C, les cellules sont récupérées par centrifugation et suspendues dans le tampon approprié à l'activité de la phospholipase A₂ (tampon Tris pH 8,5) afin d'obtenir une solution dont la DO est égale à 0,450. Cette solution est répartie en 9 tubes de 4 ml, chaque tube reçoit la quantité d'enzyme indiquée dans le Tableau 3. Après 2 heures d'incubation à 37° C, nous mesurons les variations de DO.

4.6.2 - Action de la phospholipase A₂ suivie de celle de la lipase.

Les cellules de *M. pneumoniae*, après incubation à 37° C pendant 2 heures en présence de diverses concentrations en phospholipase A₂ selon le procédé décrit pour la lyse par la phospholipase A₂ seule (page 52) sont centrifugées. Chacun des 9 culots est repris par 4 ml de tampon approprié à l'activité de la lipase (tampon phosphate pH 7,7). Nous ajoutons de la lipase dans chaque tube à raison de 250 μ g/ml. Les DO sont mesurés après 1 h 30 d'incubation à 37° C.

5 - Lyse par action des ultrasons

30 ml d'une suspension cellulaire de *M. pneumoniae* dont la DO est égale à 0,450 sont traités aux ultrasons pendant 1 minute 3 fois de suite à 1 minute d'intervalle, à une longueur d'onde de 14 μ (amplitude 2) dans le désin-

tégrateur utilisé lors du lavage des cellules (voire page 47). Afin d'éviter tout échauffement, la préparation est plongée dans un bain de glace. Le degré de lyse est apprécié par la mesure de la DO des prélèvements effectués à 10 secondes, 30 secondes, 1 minute, 1 minute 30 secondes, 2 minutes et 3 minutes.

D - Obtention des membranes de M. pneumoniae par centrifugation différentielle

Les membranes sont obtenues après centrifugation différentielle du lysat selon la méthode de Hollingdale et Lemcke (66) que nous avons modifiée. Le lysat cellulaire préparé lors de la manipulation précédente est centrifugé à 5000 g pendant 5 minutes afin d'écarter les cellules non lysées, celles ci subissent à nouveau une lyse et une centrifugation à 5000 g. Les deux surnageants contenant les membranes sont centrifugés à 37 000 g pendant 40 minutes. Le culot membranaire est ensuite lavé 3 fois à l'aide du tampon PBS et stocké à - 40° C dans ce même tampon à 0,1 % d'azide (P/V). Ce fractionnement est effectué sur la centrifugeuse Sorvall RC₂ rotor SS 34. Les différentes étapes de ce fractionnement sont schématisées sur la figure 4.

E - Microscopie électronique

Afin de vérifier l'efficacité de la lyse et de la centrifugation différentielle, les échantillons cellulaires et membranaires sont observés au micros-

cope électronique.

Les préparations A , B et C indiquées sur la figure 4 sont traitées par le fixateur glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium-rouge de ruthenium selon la méthode de Luft (94, 95). La fixation est suivie d'une déshydratation à l'alcool et d'une inclusion dans l'épon (96).

Les diverses étapes de cette manipulation sont détaillées en annexe technique (page 126).

Sur les blocs de résine durcie comportant les préparations A , B et C nous pratiquons des coupes fines à l'ultramicrotome (MT2 Porter Blum) qui sont déposées sur des grilles de cuivre nu. Les coupes sont colorées en déposant les grilles pendant 1 minute 30 secondes sur une goutte de colorant de Reynolds (130) préalablement versée sur une couche de cire. Après un léger rinçage avec de l'eau distillée et avoir épongé les grilles sur un papier buvard, les observations sont faites sur microscope électronique Jeol 120 CX. Les grilles peuvent être conservées pour une observation ultérieure.

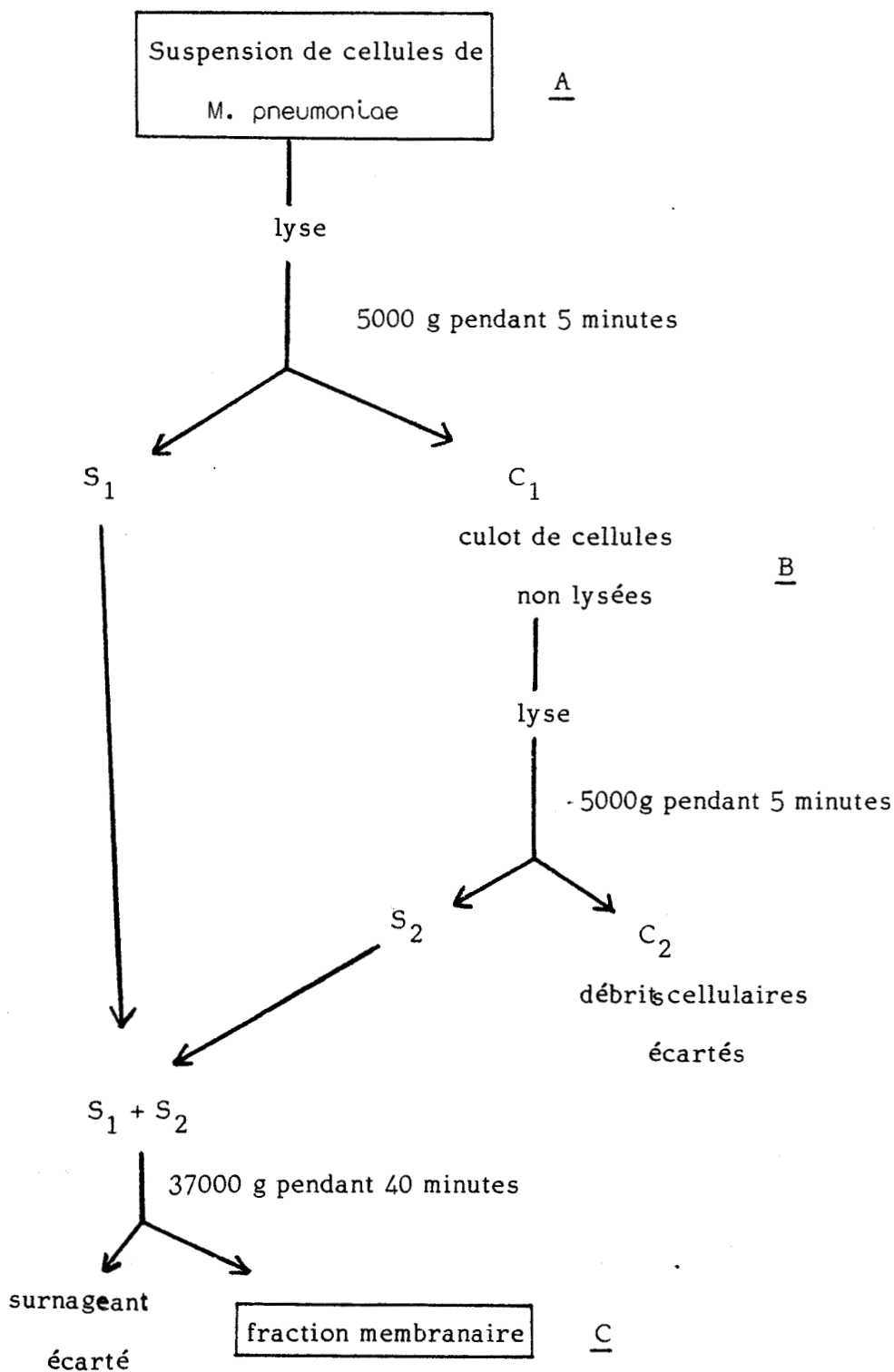


Fig 4 : Schématisation du fractionnement des cellules de *M. pneumoniae* lysées. A, B, et C sont les échantillons observés au microscope électronique

III RESULTATS ET DISCUSSION

A - Contenu des cultures

1 - Aspect des colonies de M. pneumoniae sur milieu solide

La présence de M. pneumoniae est vérifiée par observation au microscope optique de colonies de 10 à 500 μ de diamètre. En vieillissant, les colonies deviennent légèrement brunâtres et leur centre est enchassé dans la gélose, ce qui leur donne un aspect "oeuf sur le plat" très caractéristique (fig 5).

2 - Concentration en microorganismes des milieux de culture

Des essais préliminaires nous ont permis d'évaluer l'efficacité de l'utilisation des billes de verre dans les flacons de culture :

Concentration en microorganismes vivants des flacons sans billes de verre	$5 \cdot 10^7$ à 10^8 . CFU/ml
--	----------------------------------

Concentration en microorganismes vivants des flacons avec billes de verre	10^8 à 10^9 . CFU/ml
--	--------------------------

Ces chiffres représentent des moyennes de 10 essais effectués séparément. Dans les 2 cas, le milieu est toujours limpide, après 7 jours d'incubation ; il devient légèrement trouble après agitation forte au vortex,

cette agitation permet de détacher les microorganismes des surfaces de verre. La concentration de 10^9 CFU/ml est la plus élevée que nous avons trouvée, elle correspond aux concentrations les plus fortes citées en littérature (116, 158).

B - Lyse étudiée par les variations de DO à 500 nm

1 - Lyse osmotique

La souche *M. pneumoniae* FH est bien résistante à la lyse osmotique (fig 6) comme l'avaient affirmé Banai et coll (9). Elle conserve cette propriété même après un précontact des cellules avec du glycérol 2M : Après précontact des cellules de *M. pneumoniae* avec du glycérol 2M nous avons :

- DO de la suspension cellulaire plongée dans l'eau distillée	0,380
- DO de la suspension cellulaire plongée dans du glycérol 2M	0,450

La différence entre nos résultats et ceux de Kahane et Brunner (77) qui obtenaient une lyse effective de la souche *M. pneumoniae* FH par ce procédé, peut s'expliquer par la différence de milieu de culture utilisé. En effet les propriétés physiques de *M. pneumoniae*, notamment la réponse à la lyse osmotique, varient selon le milieu et l'âge de la culture (119).

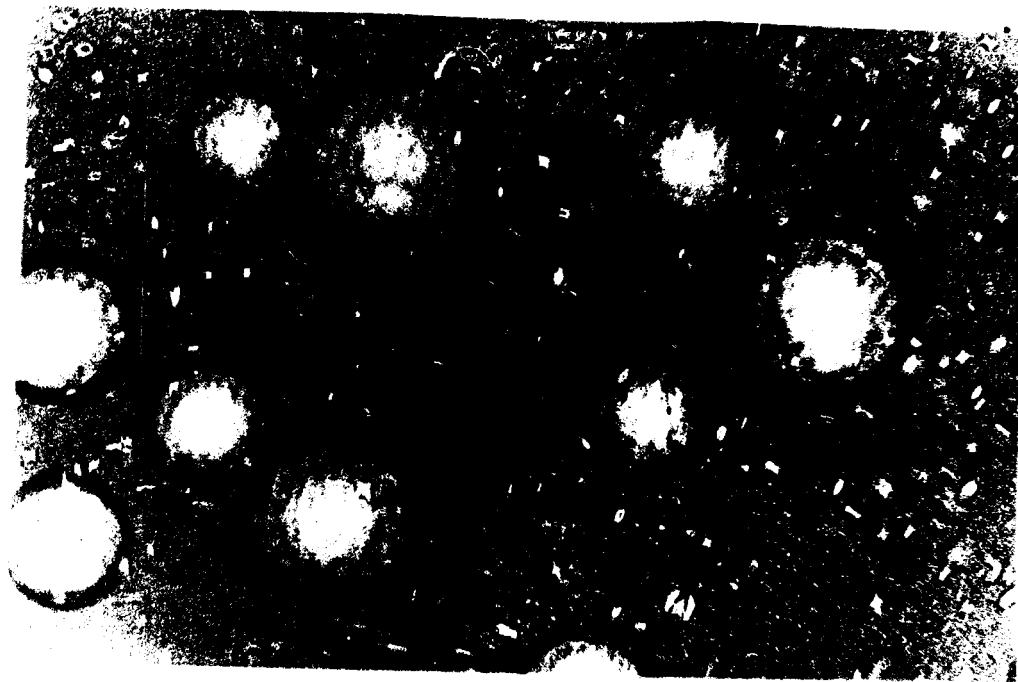


Fig5 : Colonies de *M.pneumoniae*
(grossissement X 180)

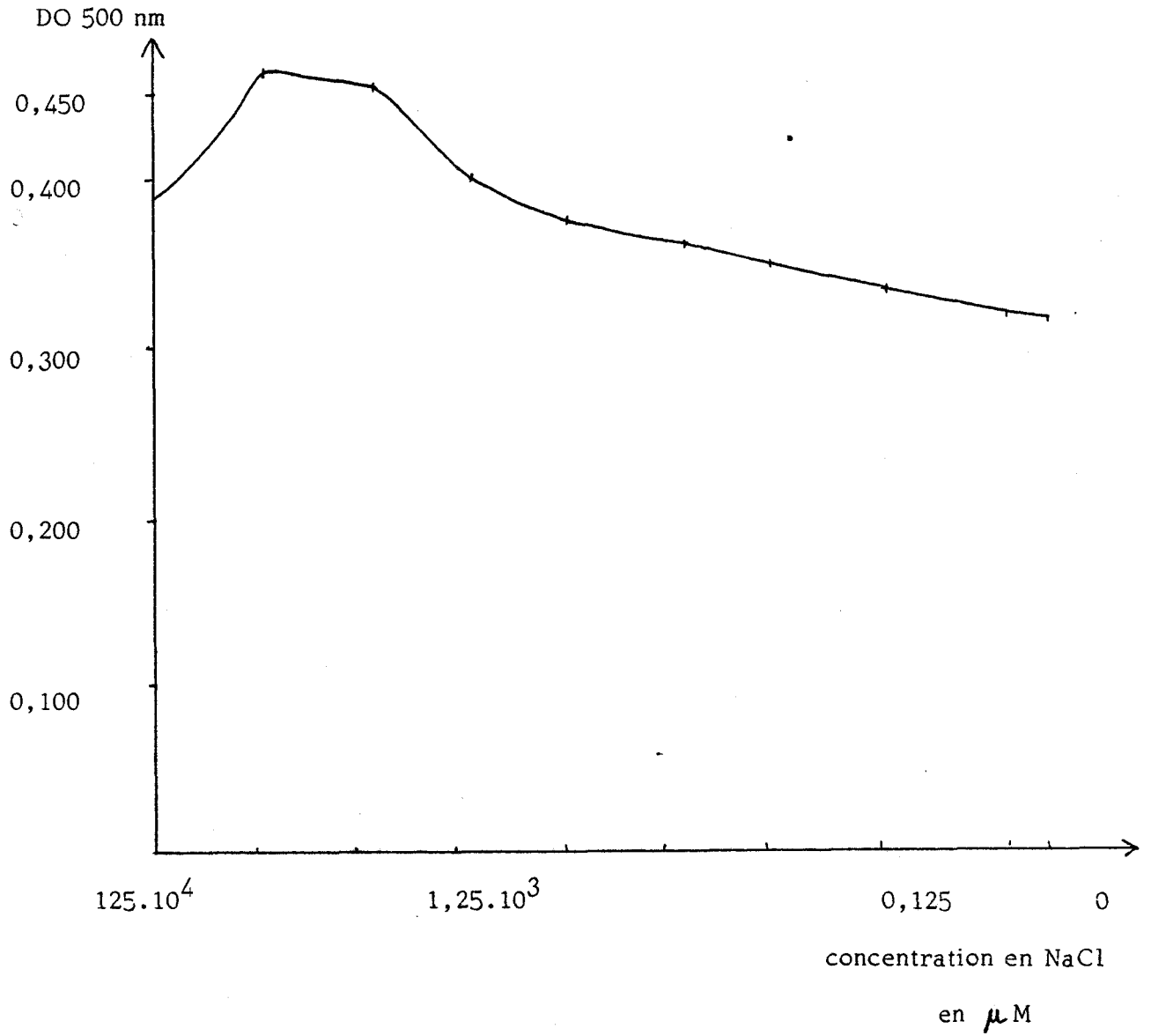


Fig 6 : Evolution de la DO mesurée à 500 nm au cours de la lyse osmotique de *M. pneumoniae*

2 - Lyse enzymatique

Les enzymes lipolytiques n'entraînent pas la lyse de *M. pneumoniae* (fig 7). De plus, l'utilisation successive de lipase et de phospholipase A₂, quel qu'en soit l'ordre, donne les mêmes résultats que l'action simultanée des 2 enzymes (fig 8).

La diminution de la DO que l'on observe aux faibles concentrations en lipase s'expliquerait par une dissociation des agrégats résiduels de *M. pneumoniae*. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Boatman et Kenny (18) qui utilisaient la lipase pour désintégrer de petites sphérules de *M. pneumoniae* de 28 μ de diamètre en moyenne formées dans les milieux de culture.

D'autre part il est possible que tous les lipides membranaires n'aient pas été atteints par les enzymes utilisés. Les protéines membranaires pourraient protéger certains lipides, un traitement protéolytique précédant l'action de la lipase et de la phospholipase A₂ conduirait peut-être à une lyse effective. Mais de telles manipulations risquent d'alourdir considérablement la préparation de membranes, notre but étant d'obtenir de façon relativement simple une fraction membranaire de bonne qualité.

3 - Lyse par exposition aux ultrasons

L'étude des suspensions de *M. pneumoniae* soumises à l'action des ultrasons (fig 9), durant des temps différents, montre que la lyse est effective

après 1 minute de traitement. L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que la lyse des cellules de *M. pneumoniae* est obtenue rapidement.

Seule une observation au microscope électronique des diverses fractions obtenues après centrifugation différentielle du lysat permettra d'affirmer si ce procédé n'a pas trop endommagé les membranes.

C - Observation au microscope électronique des fractions cellulaire et membranaire de *M. pneumoniae*

Les fractions observées au microscope électronique sont les suivantes :

A Suspension de cellules de *M. pneumoniae* (fig 10.A)

Nous observons des cellules rondes de 300 à 500 nm de diamètre limitées par un double feuillet membranaire. De rares champs présentent des formes légèrement filamenteuses.

B Culot de cellules non lysées (fig 10.B)

Cette fraction obtenue après une 1ère exposition de 1 minute aux ultrasons et centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes (fig 3) doit présenter des cellules de *M. pneumoniae* non lysées. Nous remarquons que des membranes ont été entraînées par les cellules complètes lors de la centrifugation.

C Fraction membranaire (fig 10.C)

La préparation obtenue après centrifugation différentielle du lysat

présente de nombreuses vésicules membranaires. De nombreux auteurs (6, 146) affirment qu'une exposition plus longue aux ultrasons entraîne une altération de la membrane avec une perte possible des sites antigéniques.

La culture dans le milieu de Hayflick à l'aide de billes de verre et la lyse de *M. pneumoniae* par exposition aux ultrasons sont des techniques relativement simples à réaliser. Elles nous ont permis d'obtenir après centrifugation différentielle une préparation de membranes de *M. pneumoniae* sur laquelle nous effectuerons une extraction des protéines, mais une telle étude de composants membranaires n'est possible que si l'exposition aux ultrasons n'excède pas 1 minute.

*

*

*

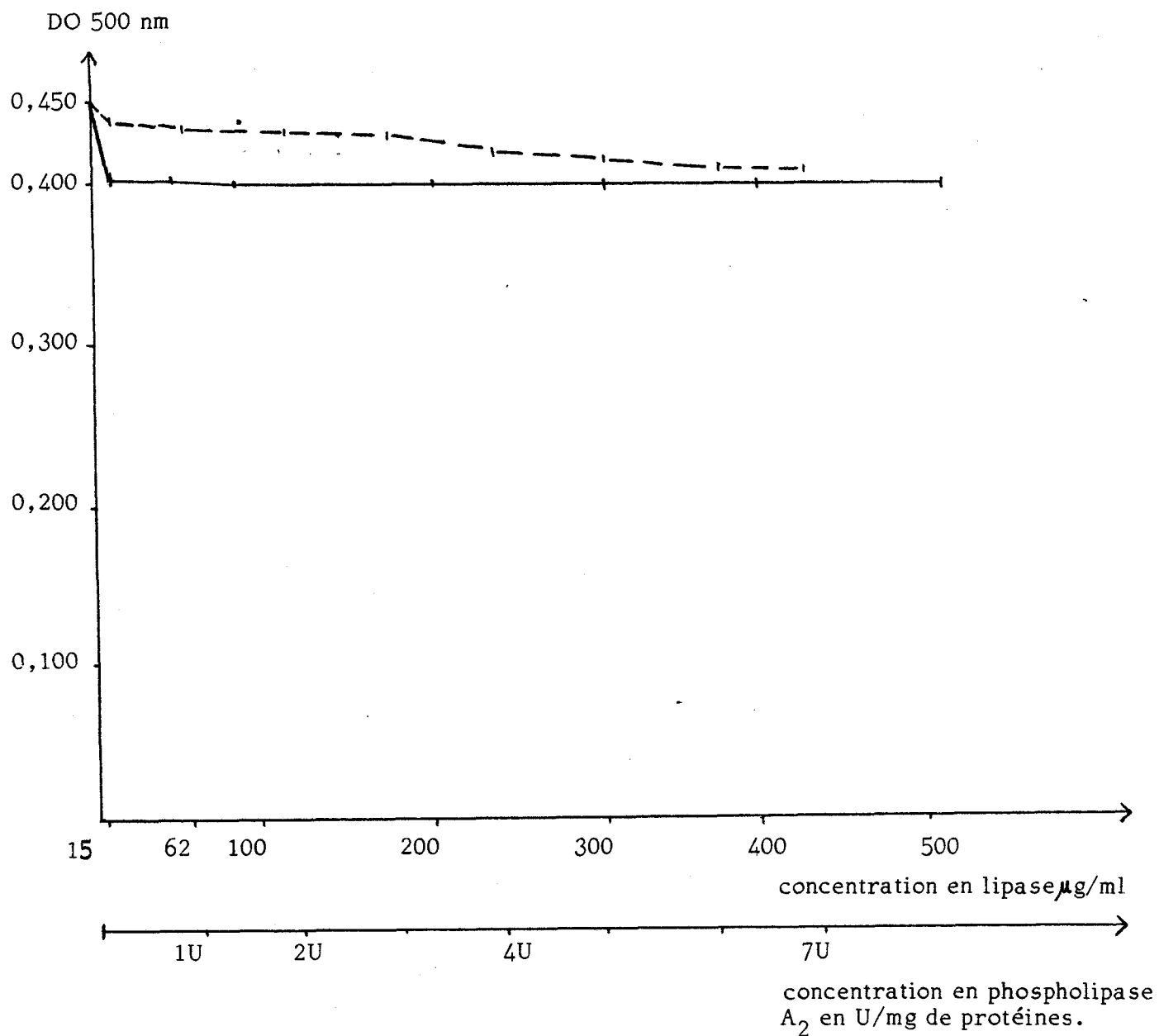


fig 7 : Evolution de la DO mesurée à 500 nm au cours de l'action d'enzymes lipolytiques sur *M. pneumoniae*

- : action de la lipase
- - - - - : action de la phospholipase A₂

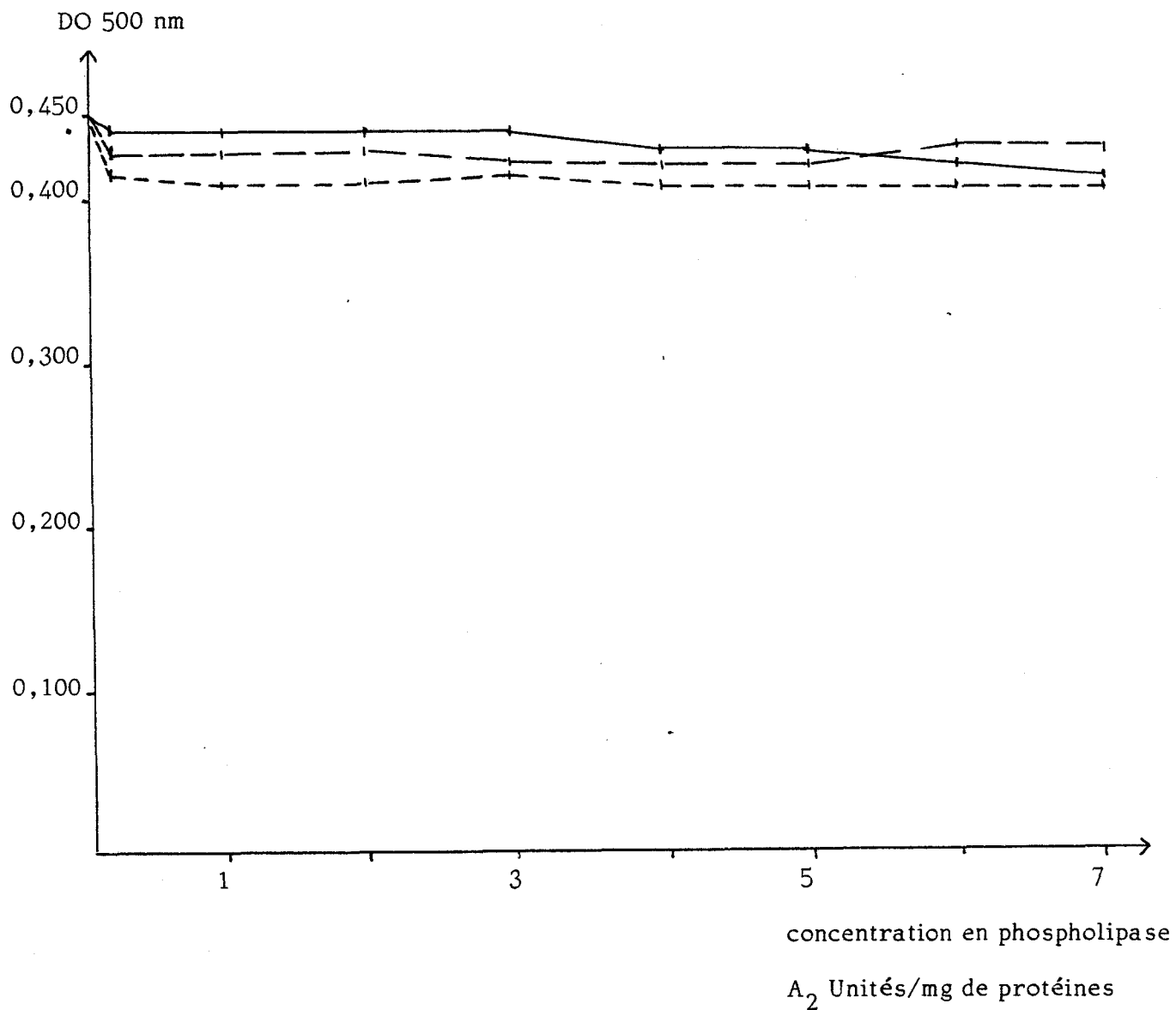


Fig 8 : Evolution de la DO mesurée à 500 nm au cours de l'action combinée d'enzymes lipolytiques sur *M. pneumoniae*

- actions simultanées de la lipase et de la phospholipase A₂
- actions de la lipase suivie de celle de la phospholipase A₂
- .- actions de la phospholipase A₂ suivie de celle de la lipase.

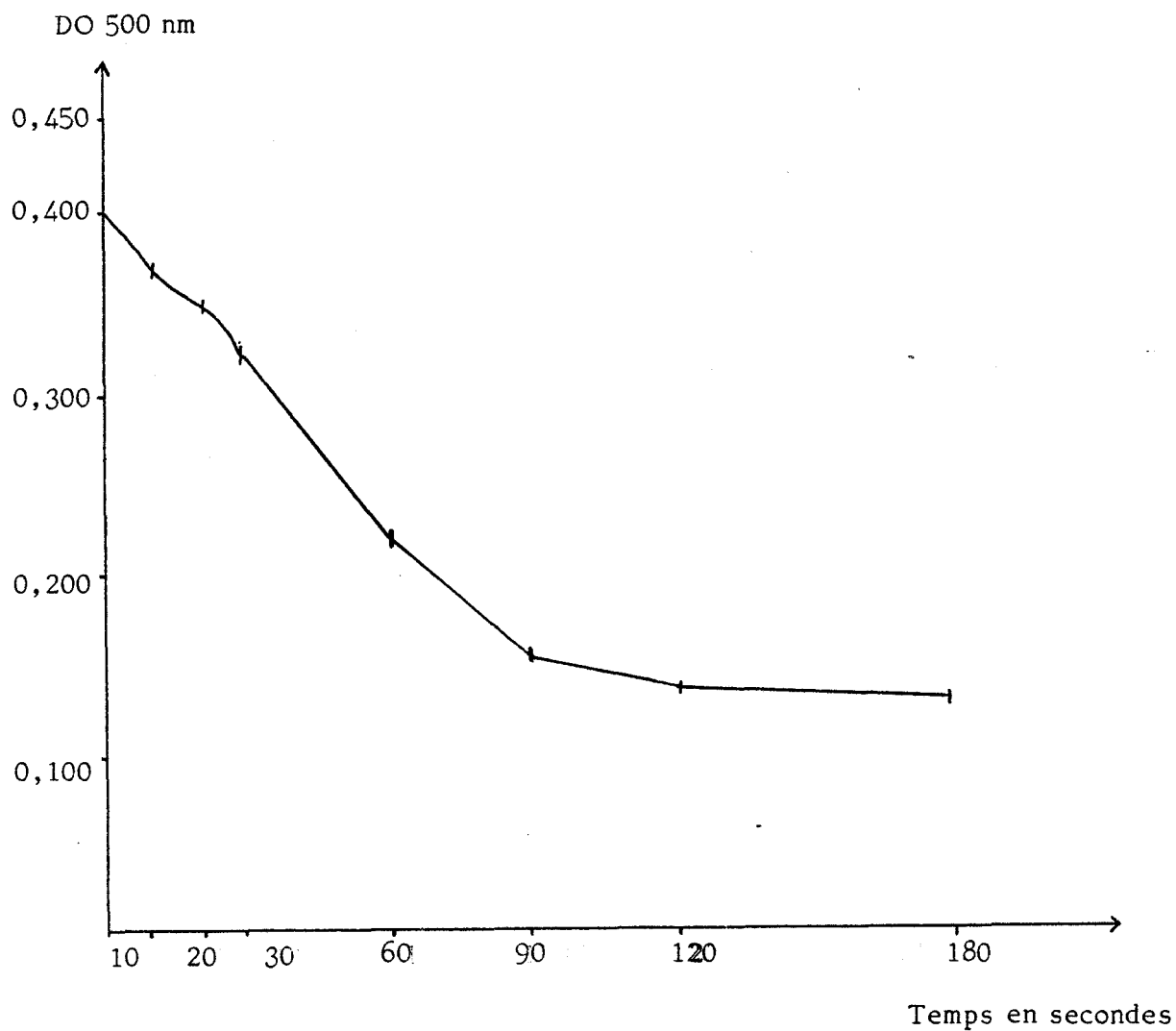
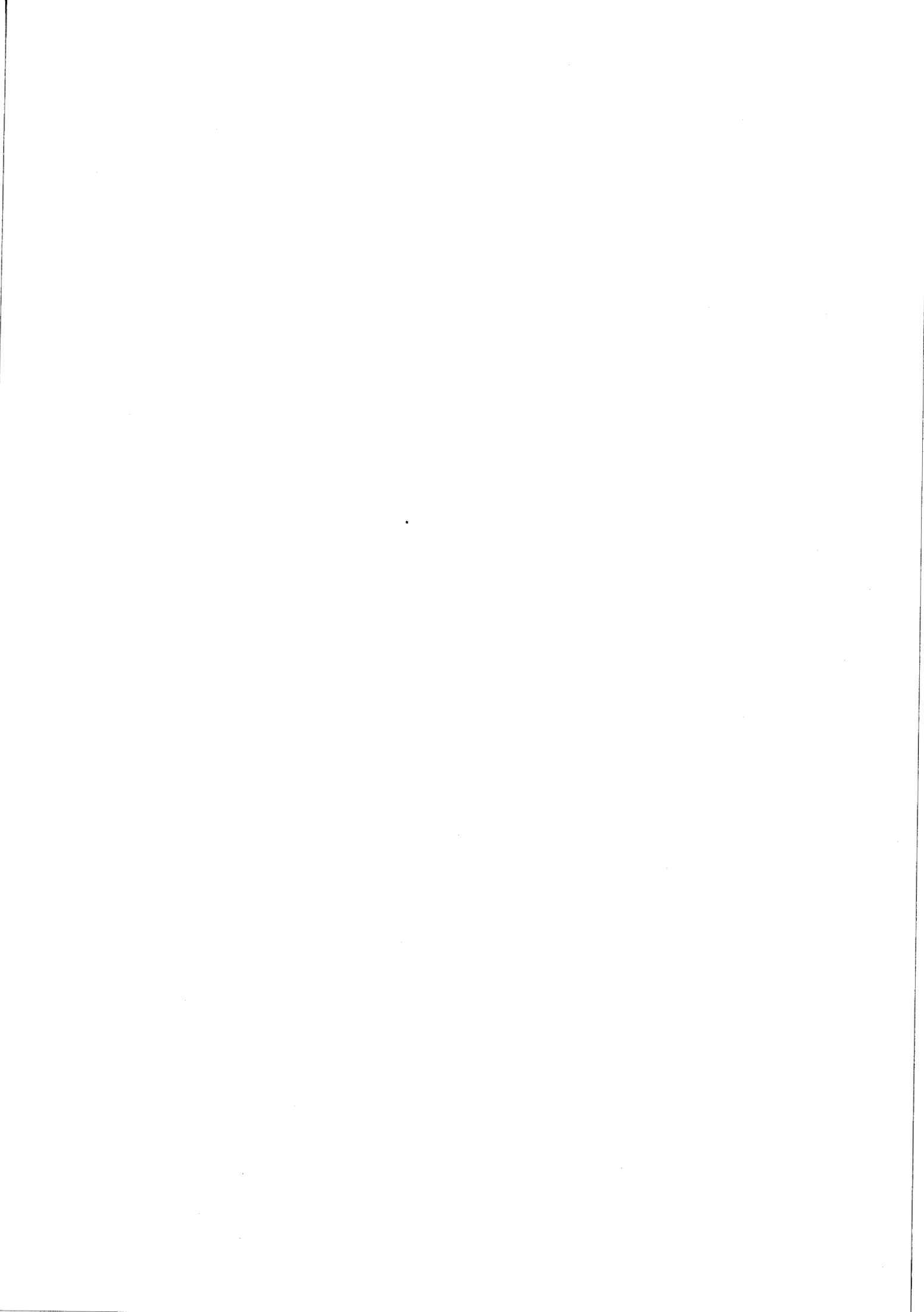
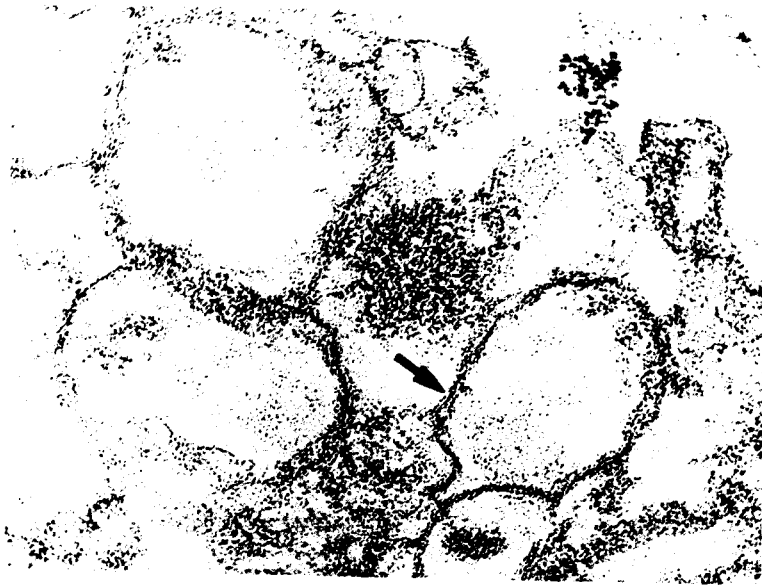


Fig 9 : Evolution de la DO mesurée à 500 nm et au cours de la lyse de *M. pneumoniae* par action des ultrasons pendant des temps différents





CHAPITRE III

**Extraction des antigènes membranaires
protéiques de *Mycoplasma pneumoniae***

I - INTRODUCTION

Le problème essentiel posé par la membrane pour l'obtention des protéines réside dans le caractère hydrophobe de leurs protéines qui, selon le modèle de la "mosaïque fluide" de Singer et Nicolson (147, fig 1) s'insèrent plus ou moins profondément dans le double feuillet lipidique. Elles font saillie sur l'une ou l'autre face de la membrane. Un certain nombre d'entre elles traversent toutefois l'épaisseur de la membrane et apparaissent donc sur les 2 faces. La portion des protéines entrant en contact avec les lipides est toujours hydrophobe, ce qui n'exclut pas évidemment, que la portion qui fait surface puisse être hydrophile. Les protéines membranaires sont cependant globalement hydrophobes. Toutes ces connaissances proviennent de nombreux travaux effectués sur la membrane des érythrocytes (19, 46, 157).

Pour les membranes de *M. pneumoniae* la présentation des protéines est exactement la même (6).

En 1969, Kahane et Razin (79) affirmaient que l'analyse sérologique était rendue difficile à cause de la solubilisation des antigènes membranaires de nature protéique. Cette solubilisation nécessite l'intervention de détergent ionique comme le dodécyl sulfate de sodium (SDS). La technique de séparation des protéines membranaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS : PAGE-SDS (46, 137, 176) est actuellement le procédé le plus utilisé. D'ailleurs, la technique d'électrophorèse discontinue sur gel de polyacrylamide en présence de SDS de Laemmli (85) est considérée comme la méthode de choix pour la purification de protéines. Nous utiliserons ce procédé.

Après la séparation, les protéines incluses dans le gel peuvent être récupérées de 3 façons :

1) Par solubilisation du gel de séparation :

Le gel de séparation est soluble si l'agent de pontage utilisé est le DHEBA (N - N' 1,2 - dihydroxyéthylène-bisacrylamide) ou le DATD (N - N' - diallyltartardiamide) à la place du N N' méthylène bisacrylamide. Mais la solubilisation de ces gels par l'acide périodique ou les solutions alcalines peuvent modifier l'état des protéines et contaminer l'éluat final. Cette méthode est surtout utilisée pour déterminer la quantité de protéines incluses dans le gel (106, 162).

2) Par diffusion des protéines :

Les gels sont homogénéisés dans un tampon adéquat, les protéines diffusent et sont récupérées après centrifugation. Cette méthode a le désavantage d'obtenir un grand volume d'extrait protéique et le rendement est assez bas (89).

3) Par élution électrophorétique :

Après séparation électrophorétique, les gels sont sectionnés. les disques de gel contenant les protéines désirées sont ensuite empilés dans un tube à l'extrémité duquel est fixé un sac de dialyse. Après élution électrophorétique, les protéines sont bloquées dans le sac de dialyse. Avec ce procédé les protéines éluées sont concentrées dans un petit volume (89) et le rendement de récupération est assez élevé, il peut approcher les 90 % (63). Nous utilisons cette technique.

Ayant choisi les méthodes de séparation et de récupération, il nous

reste à déterminer les protéines à éluer. Nous avons choisi de récupérer les protéines lourdes de la membrane pour deux raisons :

-La majorité d'entre elles sont responsables de la pathogénicité de *M. pneumoniae* (voire page 17)

-Elles sont immunogènes comme l'ont démontré P. Hu et coll en 1981 (70).

Nous n'établirons pas la position de la protéine majeure d'attachement P_1 sur nos gels car il existe une discordance entre D.C. Krause et coll (84) et P. Hu et coll (69) pour l'évaluation de sa masse moléculaire :

selon D.C. Krause : 165 000 Daltons

selon P. Hu : 190 000 Daltons

Aussi Feldner et coll (51) indiquent dans leurs travaux une masse moléculaire 160 000 à 190 000 Daltons pour la protéine P_1 .

D'autre part, la similitude des masses moléculaires des protéines membranaires après PAGE-SDS n'indique pas nécessairement l'identité (71). L'essentiel est d'obtenir l'ensemble des protéines lourdes incluant P_1 , nous savons que la souche *M. pneumoniae* FH utilisée comporte les protéines responsables de l'attachement car elle est capable d'adhérer sur les surfaces de verre (49). En effet, les souches mutantes isolées (84) ne présentant pas cette propriété, sont déficientes en protéines d'attachement.

Enfin, nous contrôlerons l'antigénicité des protéines électroéluées

par la méthode de précipitation en gel d'agarose d'Ouchterlony (112) en utilisant un immunsérum de lapin anti membranes de *M. pneumoniae*.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Dosage des protéines

1 - Des fractions cellulaires et membranaires

Il est réalisé par la méthode de Lowry modifiée par Markwell et coll (98) avec référence à une gamme étalon de sérum albumine bovine (Sigma Chemical Co, voire annexe technique page 124).

2 - Des éluats

Comme le volume des éluats est petit, nous utiliserons la méthode de Bradford (23) qui est légèrement plus sensible que celle de Lowry (93) (voire annexe technique page 130).

B - Fractionnement des protéines membranaires de M. pneumoniae selon la méthode de Laemmli (85)

1 - Principe

Les protéines se dissocient de la membranes par l'action combinée du β mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfure et du SDS qui déroule les chaînes polypeptidiques en s'y liant. Les polypeptides ainsi traités sont tous chargés négativement (ions sulfate du SDS) et la séparation s'effectuera en

fonction de leur masse moléculaire. La technique de Laemmli est une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration. Le mélange de polypeptides migre du gel le plus poreux vers le gel le moins poreux, ce processus s'accompagnant d'une modification de pH.

1er gel : gel de concentration ("Stacking Gel") 3 à 4 % d'acrylamide, pH 6,7

Dans cette partie de gel, chaque type de polypeptide se concentre dans une zone étroite en bande mince.

2ème gel : gel de séparation ("Separating Gel") 5 à 15 % d'acrylamide, pH 8,8

Les diverses bandes de polypeptides se séparent selon leur masse moléculaire. Une forte concentration en acrylamide de 13 % par exemple bloque les grosses molécules et favorise la migration des protéines à faible masse moléculaire (M M 50 000 Daltons). Par contre un gel de séparation à 7 % d'acrylamide est conseillé pour la séparation des protéines dont la masse moléculaire excède 150 000 Daltons.

2 - Appareillage

2.1 - Cuve d'électrophorèse

Nous utilisons une cuve d'électrophorèse "gel column electrophoresis unit" (Gelman Instrument Co) qui comporte 12 tubes de verre de 105 mm de long, 7 mm de diamètre extérieur et 5 mm de diamètre intérieur. Chaque tube de verre supporte une petite colonne de gel le long duquel s'effectuera la séparation des protéines membranaires.

2.2 - Générateur

La séparation électrophorétique s'effectuera au moyen d'un générateur SEBIA GD - 251.

3 - Préparation des gels

Chaque tube de support comportera 8,5 cm de gel de séparation et 1 cm de gel de concentration. La teneur en acrylamide du gel de concentration est de 4 %, nous comparerons 3 concentrations d'acrylamide pour le gel de séparation : 7,5 %, 10 %, et 13 %. Nous utilisons la méthode de Laemmli pour la préparation de ces gels (voire annexe technique page 132).

4 - Préparation des échantillons

4.1 - Echantillons membranaires

Les échantillons sont obtenus en portant au bain marie bouillant pendant 5 minutes les préparations membranaires dans le tampon :

0,0625 M..... Tris HCl
2 %..... SDS
5 %..... β mercaptoéthanol
pH 6,8

Le chauffage préliminaire permet la dissociation complète des protéines. Nous ajoutons ensuite 15 % de glycérol pour éviter, lors de la mise en route de l'électrophorèse, la diffusion des protéines dans le tampon de migration, et 0,005 % de bleu de bromophénol qui sert de témoin de migration.

Les échantillons sont enfin centrifugés à 25 000 g pendant 20 minutes afin de déplacer les résidus non dissous.

4.2 - Echantillons de protéines standards de masses moléculaires connues

Les masses moléculaires des protéines membranaires sont déterminées par coélectrophorèse de protéines standards de masses moléculaires connues :

- HMW Kitt : Pharmacia Fine Chemical
- MW - SDS - 70 : Sigma Chemical Co.

La reconstitution de ces protéines lyophilisées est effectuée avec le tampon utilisé pour la préparation des échantillons membranaires. Une fois reconstitués, ces échantillons sont conservés en aliquots à -40° C.

Le HMW Kitt comporte :

- Thyroglobuline..... 330 000 Daltons
- Ferritine..... 220 000
- Albumine..... 67 000
- Catalase..... 60 000
- Lactate déshydrogenase..... 36 000
- Ferritine (sous unité)..... 18 500

La sous unité de ferritine de masse moléculaire 18 500 Daltons est obtenue en portant l'échantillon au bain marie à 60° C pendant 15 minutes. Les protéines du MW-SDS-70 utilisées sont :

- Albumine d'oeuf..... 45 000 Daltons
- Trypsinogène..... 24 000

Après migration, une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et la mobilité électrophorétique de chacune des protéines peut être établie.

Nous exprimons la mobilité électrophorétique par le Rf :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par la protéine}}{\text{distance parcourue par le bleu de bromophénoïl}}$$

et nous traçons le graphe $\log MM = f (Rf)$

En rapportant les Rf des protéines membranaires sur ce graphe, nous connaissons leurs masses moléculaires.

5 - Migration

150 μ l d'échantillon membranaire contenant 150 à 250 μ g de protéines sont déposés sur les 3 tubes supportant les gels 7,5 ; 10 et 13 %. 40 μ l d'échantillons de protéines standards contenant environ 80 μ g de protéines sont déposés sur un tube supportant un gel à 10 % d'acrylamide. Les tubes sont introduits dans la cellule d'électrophorèse de manière à ce que leurs extrémités inférieures baignent dans le tampon, ils sont remplis de tampon d'électrophorèse avec précaution afin de ne pas mélanger le tampon avec les échantillons :

tampon de migration : 0,025 M..... Tris
 0,192 M..... Gly
 0,1 %..... SDS
 pH 8,3 ajusté avec HCl 1N.

Ce tampon se conserve à + 4° C et peut être utilisé pendant 2 semaines à raison de 2 migrations par semaine. La partie supérieure de la cellule est remplie et la migration électrophorétique s'effectue sous une intensité

constante de 1 m A par gel pendant 1 heure, au terme de laquelle le bleu de bromophénol se situe à l'interface entre le gel de concentration et le gel de séparation. A ce moment là, nous augmentons l'intensité à 2 m A par gel et au bout de 3 heures environ le bleu de bromophénol arrivera à 1 cm de l'extrémité inférieure du tube.

6 - Fixation, coloration et décoloration

Après démoulage, les gels sont fixés pendant 10 heures dans la solution suivante :

400 volumes de méthanol

70 volumes d'acide acétique

530 volumes d'eau distillée

Nous changeons plusieurs fois de bains.

Après fixation, les gels sont colorés pendant 4 heures dans la solution de coloration :

227 ml de méthanol

46 ml d'acide acétique

227 ml d'eau distillée

1,25 g de Coomassie Brilliant Blue R (Sigma Chemical Co)

Le colorant est stocké à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire. La décoloration s'effectue par simple diffusion dans la solution de fixation sous une légère agitation. Dans ces conditions 72 heures au moins sont nécessaires pour obtenir des gels parfaitement décolorés même avec de nombreux changements de bains.

7 - Conservation des gels

Les gels peuvent être conservés à l'abri de la lumière, dans la solution de conservation :

50 ml de méthanol

75 ml d'acide acétique

QSP 1 litre avec de l'eau distillée

Cette solution peut être conservée plusieurs mois à la température du laboratoire, elle ne peut être utilisée qu'une seule fois.

8 - Obtention des protéines membranaires lourdes

Elle s'effectue en 2 temps. Dans un premier temps, les protéines membranaires de *M. pneumoniae* sont séparées dans le gel déterminé lors de l'expérience précédente (7,5 % ; 10 % ou 13 %). Dans un 2^{ème} temps, les protéines lourdes incluses dans les disques de gel obtenus après sectionnement des boudins d'acrylamide sont éluées électrophorétiquement. L'obtention des protéines lourdes est schématisée sur la figure 11.

1 - 1er temps : Localisation des protéines lors de la séparation électrophorétique par coélectrophorèse de sérum albumine bovine (SAB) précolorée au Remazol Brilliant Blue R (RBBR).

La localisation des fractions protéiques pendant la séparation électrophorétique s'obtient en faisant migrer parallèlement aux échantillons membra-

naires déposés sur les 11 gels "préparatifs" une protéine de masse moléculaire connue : la sérum albumine bovine ou SAB (monomère de masse moléculaire 67 000 Daltons : Sigma Chemicals Co) précolorée au Remazol Brilliant blue R (RBBR : Sigma Chemicals Co) selon le procédé de Griffith (59, 177) que nous avons simplifié (voire annexe technique page 136). 10 μ l d'échantillon contenant 20 μ g de SAB précolorée sont déposés sur le 12ième gel : gel marqueur.

L'avantage de cette technique réside dans le fait que les zones de gel comportant les protéines désirées sont facilement et rapidement localisées par rapport à la position de la SAB précolorée.

Le temps de coloration et décoloration d'un gel témoin et le stockage des gels "préparatifs" au congélateur sont évités. De plus cette méthode (89) faisant intervenir coloration et décoloration d'un gel témoin nécessitait l'emploi d'un facteur de correction pour localiser les protéines des gels "préparatifs" car le gel témoin s'était allongé lors de la coloration et de la décoloration ; ce qui compliquait la phase de sectionnement des gels.

2 - 2ième temps : Elution électrophorétique des protéines lourdes dans les sacs de dialyse

Après migration, le gel marqueur est déposé près des 11 gels "préparatifs" et pour chaque gel la région située au dessus de la SAB précolorée est sectionnée selon la technique de Lewis et Clark (89) avec une lame de rasoir ordinaire. Les 11 disques de gel sont ensuite empilés dans 2 tubes de verre de

85 mm de long ayant l'extrémité inférieure réduite à un diamètre de 4 mm (fig 12), afin d'éviter tout glissement du gel hors du tube lors de l'élution électrophorétique. Un gel à 7,5 % d'acrylamide est utilisé pour introduire ces disques de gel le long des parois du tube et enlever les bulles d'air. Un tube de dialyse de 6 mm de diamètre (Union Carbide Film) initialement régénéré dans une solution 0,01 M EDTA portée à ébullition pendant 30 minutes et rincé vigoureusement à l'eau distillée est fixé à la base de chaque tube avec un caoutchouc selon le procédé de Stephens (159).

Les différentes phases de la fixation sont schématisées sur la figure 12 :

- le diamètre du tube de dialyse étant légèrement inférieur à celui du tube d'élution, il suffit d'écarter légèrement les bords afin d'y glisser le tube d'élution.

- Nous remplissons le tube de dialyse de tampon d'électrophorèse.

- Nous fermons énergiquement le tube de dialyse par un double noeud afin d'obtenir un volume de chambre d'élution n'excédant pas 300 μ l et en évitant toute formation de bulles d'air qui pourraient nuire à l'élution électrophorétique.

- Pour plus de sécurité, nous renforçons la fixation du tube de dialyse sur le tube d'élution par un simple caoutchouc.

L'élution électrophorétique s'effectue sous une intensité constante de 4 mA par tube d'élution avec le tampon de migration (pH 8,3) utilisé pour la séparation. La progression de la migration est facilement suivie par coélectroélution de SAB précolorée au RBBR. A cet effet, un tube d'élution ayant des dis-

ques de gels qui comportent la SAB précolorée est préparé de la même façon que les tubes d'élution contenant les protéines de mycoplasmes. Quand toute la protéine colorée est située dans le sac de dialyse, c'est à dire après 10 heures de migration environ, les sacs de dialyse sont délicatement coupés à la lame de rasoir et leurs contenus sont récupérés à la micropipette et stockés à - 40° C.

D - Méthode pour l'étude de l'antigénicité des protéines électroéluées

Cette étude nécessite des anticorps anti *M. pneumoniae*.

1 - Préparation des immunosérums

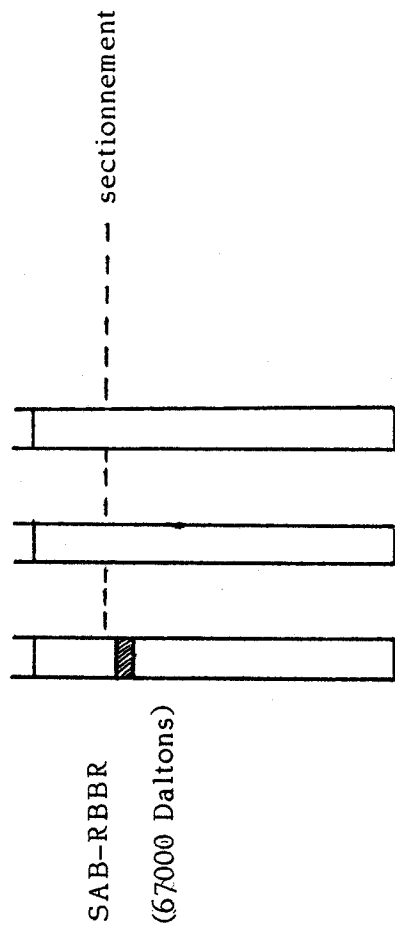
Deux lapins (race française : géant des Flandres) sont immunisés selon la méthode de Razin et coll (128) légèrement modifiée. Un mélange de 1 ml de suspension membranaire et 1 ml d'adjuvant complet de Freund est injecté par voie intradermique à plusieurs endroits du dos. Le même volume de matériel injecté mais mélangé avec de l'adjuvant incomplet est injecté de la même façon 3 semaines plus tard. Le sang est recueilli au niveau de la veine marginale de l'oreille :

- sérum négatif : obtenu avant toute injection d'antigène,
- sérum positif : obtenu 2 semaines après la 2ième injection d'antigène.

Comme le sérum présente des anticorps contre le milieu de culture, il est absorbé avec le milieu de culture selon le procédé de Kahane et Razin (79, voire annexe technique page 138) avant d'être stocké en aliquots à - 40° C.

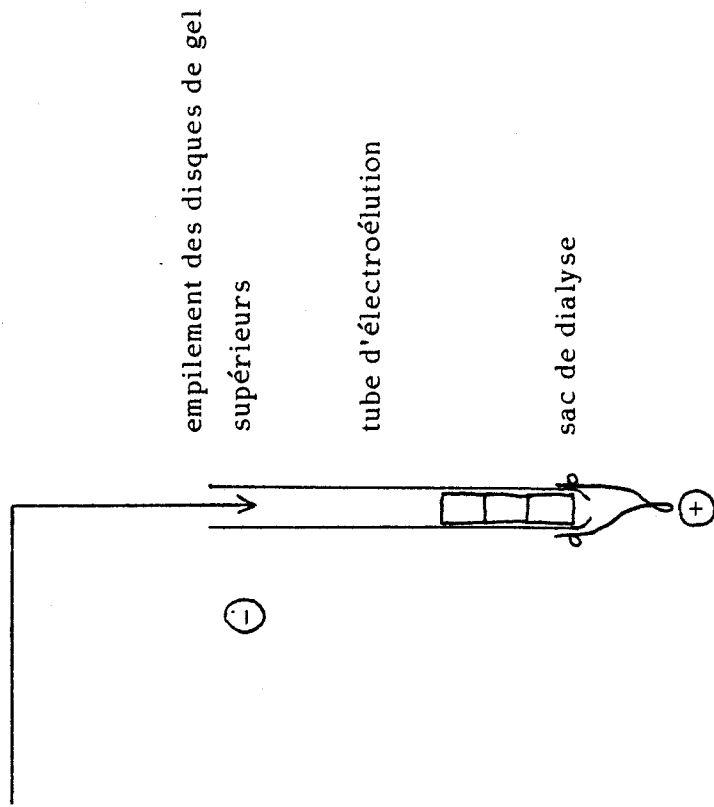
1er temps : localisation des protéines lourdes

par coélectrophorèse de SAB-RBBR



2ème temps : Elution électrophorétique des protéines

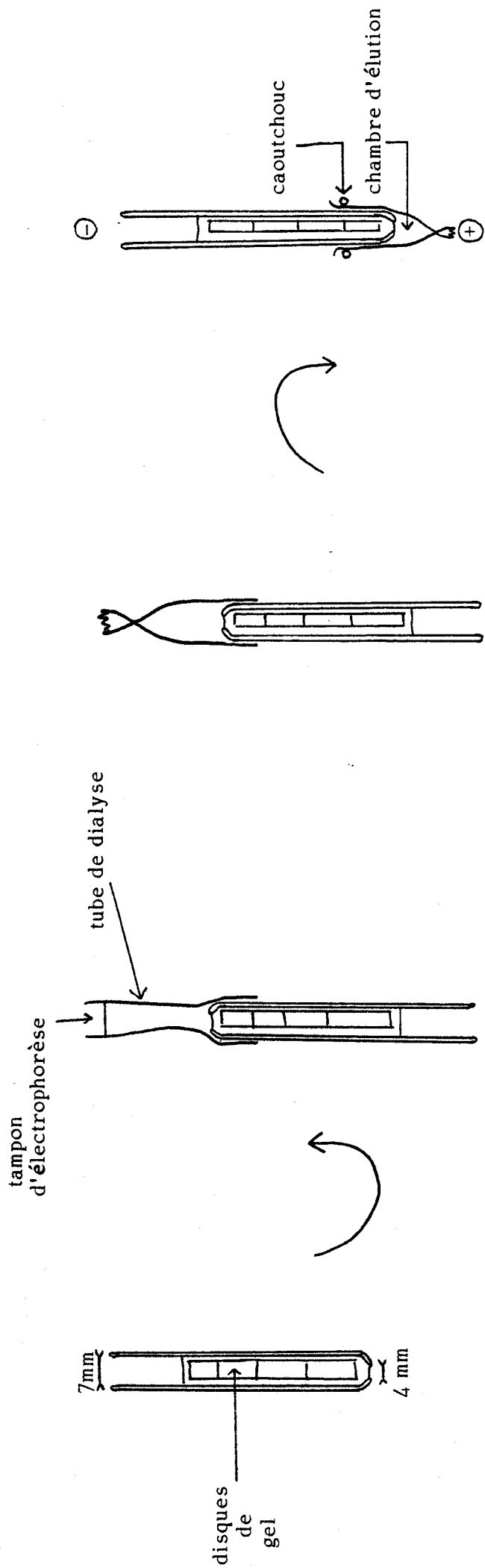
lourdes dans les sacs de dialyse



gel témoin gels préparatifs
séparation des protéines mem-
branaires de *M. pneumoniae*

Fig 11 : Obtention des protéines membranaires lourdes de *M. pneumoniae* par élution électrophorétique

SAB-RBBR : Sérum Albumine Bovine précolorée au Remazol Brilliant Blue R.



1

2

3

4

Fig 12 : Différentes phases de la préparation des tubes d'élution :

1 : Empilement des disques de gel et homogénéisation avec un gel à 7,5 % d'acrylamide.

2 + 3 : Fixation du tube de dialyse sur le tube d'élution.

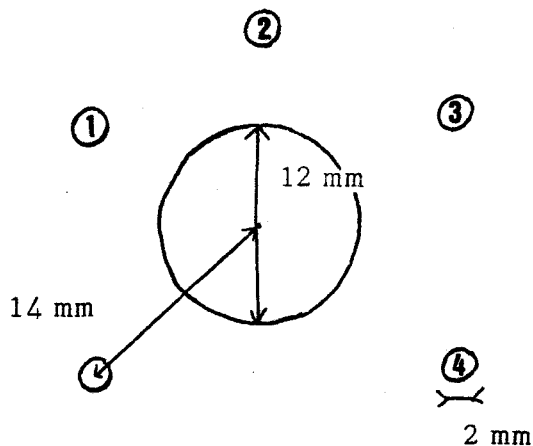
4 : Tube d'élution prêt.

2 - Méthode d'Ouchterlony (112) : réaction d'immunoprécipitation en gel d'agarose par double diffusion bidimensionnelle

C'est une réaction peu sensible mais très spécifique, elle permet l'analyse qualitative de solutions antigéniques. L'antigène et l'anticorps sont disposés dans des puits réguliers creusés dans la gélose. Ils diffusent à travers celle-ci et lorsque se trouvent réunis les concentrations de la zone d'équivalence, il y a précipitation du complexe antigène- anticorps. Nous utilisons les immunofilms réhydratables (SEBIA) adhérant à un support plastique. La réhydratation s'effectue dans l'eau distillée toute une nuit. Avant utilisation, le film est immergé pendant 2 heures dans le tampon Tris Veronal :

- 0,059 M..... Tris
- 0,01 M..... Véronal
- 0,05 M..... Véronal Na
- pH 9,2, fi 0,05

Nous éliminons l'excès de tampon à l'aide d'un papier filtre. Puis avec un emporte pièce nous réalisons les puits suivants :



puits central : 150 l d'immunsérum de lapin adsorbé contre le milieu de culture

Les puits périphériques reçoivent 10 μ l d'antigène

puits 1 : suspension membranaire solubilisée dans une solution à 1 % de SDS

puits 2 : Eluat de protéines obtenu.

puits 3 : Milieu de culture afin de vérifier l'efficacité de l'absorption du sérum avec le bouillon et le manque d'identité antigénique entre les protéines éluées et les protéines du milieu.

puits 4 : tampon d'électroélution afin de vérifier toute précipitation possible entre le tampon de Laemmli et l'immunsérum.

La diffusion s'effectue dans une chambre humide pendant 24 heures à la température du laboratoire. Après un court lavage dans le tampon tris véronal, nous photographions l'immunofilm par projection directe sur un papier photosensible.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

A - Fractionnement des protéines membranaires de M. pneumoniae

L'étude comparative des 3 gels de séparation à concentrations d'acrylamide différentes : 7,5 ; 10 et 13 % (fig. 13) permet d'attribuer à chaque type de gel une utilisation bien déterminée (Tableau 4).

Tableau 4 - Intérêts des différentes concentrations d'acrylamide pour le gel de séparation lors du fractionnement des protéines membranaires de M. pneumoniae

(gel de séparation	:	utilisation du gel)
(:)
(gel à 7,5 % d'acrylamide	:	vérification du contenu de l'éluat)
(:	final)
(gel à 10 % d'acrylamide	:	détermination des masses molé-)
(:	lares relatives des protéines)
(:	membranaires)
(gel à 13 % d'acrylamide	:	fractionnement des protéines mem-)
(:	branaires suivie d'une élution)
(:	électrophorétique des protéines)
(:	lourdes)
(:)

1 - Gel de séparation à 10 % d'acrylamide (fig 13 B)

Le gel de séparation à 10 % d'acrylamide donne la meilleure résolution des protéines de M. pneumoniae, c'est d'ailleurs ce type de gel qui fut

utilisé par différents auteurs pour déterminer les masses moléculaires des protéines de mycoplasmes (40, 69, 70). Par comparaison aux protéines standards nous pouvons donner aux protéines séparées leurs masses moléculaires relatives (Tableau 5).

Tableau 5 : Masses moléculaires relatives des 16 protéines membranaires de M. pneumoniae en gel de séparation à 10 % d'acrylamide.

(figure 13 B)

()
(190 000 Daltons)
(<u>150 000</u>)
(140 000)
(130 000)
(120 000)
(<u>110 000</u>)
(80 000)
(70 000)
(64 000)
(56 000)
(50 000)
(46 000)
(43 000)
(34 000)
(30 000)
(27 000)
()

Les 2 masses moléculaires soulignées correspondent à des protéines à la limite de la visibilité oculaire. Le nombre réel de protéines est certainement plus élevé car les protéines en faible concentration n'apparaissent pas après coloration, la limite de sensibilité pour la coloration au bleu de Coomassie est de l'ordre de 1 μ g de protéine (59).

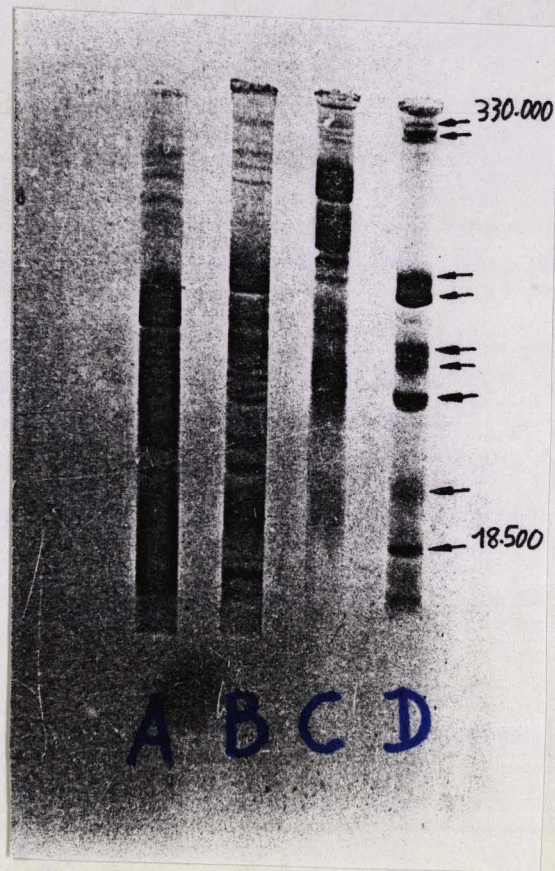


Fig 13 : Profil électrophorétique des protéines membranaires de
M.pneumoniae

A,B et C : membranes de *M.pneumoniae*

A : gel de séparation à 7,5% d'acrylamide

B : gel de séparation à 10% d'acrylamide

C : gel de séparation à 13% d'acrylamide

D : protéines standards en 10% d'acrylamide (voire masses moléculaires
pages 80 et 81)

2 - Gel de séparation à 7,5 % d'acrylamide (fig 13 A)

Ce gel de séparation permet une bonne séparation des protéines les plus lourdes, nous utiliserons ce type de gel pour vérifier le contenu de l'éluat final.

3 - Gel de séparation à 13 % d'acrylamide (fig 13 C)

Ce gel de séparation est le plus approprié pour l'élution électrophorétique des protéines désirées. En effet, les protéines les plus lourdes sont bloquées sur une distance très courte de gel, ce qui permet d'obtenir des disques de gel très petits avec le maximum de protéines. Aussi pour le fractionnement des protéines membranaires de *M. pneumoniae* nous utiliserons le gel à 13 % d'acrylamide.

B - Etude du contenu protéique de l'éluat

L'électrophorèse de SAB précolorée au RBBR s'est révélée efficace pour localiser rapidement la région du gel qui contient les protéines à isoler (fig 14 A). Nous avons obtenu un volume d'éluat égal à 400 μ l pour les 2 tubes d'élution contenant les 11 disques de gel.

1 - Etude qualitative (fig 14 B)

Une réélectrophorèse de l'éluat réalisée parallèlement à celle d'un

échantillon membranaire dans le système de Laemmli avec un gel de séparation à 7 % d'acrylamide permet d'affirmer que l'éluat comporte bien les protéines lourdes désirées (fig 14 B). Elles sont au nombre de 8, leurs masses moléculaires s'étendent de 70 000 à 190 000 Daltons (Tableau 5).

Comme nous l'avons indiqué antérieurement (voire page 75) la comparaison des masses moléculaires des protéines lourdes électroéluées et celles isolées par d'autres auteurs est difficile à réaliser. L'essentiel pour nous réside dans le fait que l'éluat obtenu contient les protéines lourdes responsables de l'attachement de *M. pneumoniae* sur les cellules hôtes.

2 - Etude antigénique

Le SDS a le désavantage de détruire les structures quaternaire et tertiaire des protéines et même en partie la structure secondaire. Les protéines dénaturées par le SDS ont une structure en forme de baguettes entourées de charges négatives (ions sulfates du SDS). Malgré cette perte de sites antigéniques, l'éluat obtenu est antigéniquement actif comme l'indique la fig 15. Une ligne de précipité spécifique se forme par immunodiffusion dans l'agar entre la solution de protéines électroéluées et le sérum préparé contre les membranes de *M. pneumoniae*, cette ligne fusionne dans une réaction d'identité avec la ligne de précipité obtenu avec des membranes solubilisées dans du SDS.

P. Hu et coll. (70) avaient rapporté antérieurement l'identification

d'immunogènes de *M. pneumoniae* : les protéines sont séparées par PAGE-SDS et transférées sur une bande de nitrocellulose par "blotting". Les protéines capables d'induire des anticorps sont détectées par immunoradiographie indirecte en utilisant un antisérum marqué à l'I¹²⁵ contre les Ig G de lapin après incubation de la bande de nitrocellulose dans du sérum de lapin immunisé. Néanmoins les protéines séparées restent sur un support et leur utilisation s'en trouve limitée, ce qui n'est pas le cas avec notre technique d'élution électrophorétique. Cette méthode a un double avantage : elle permet d'obtenir des protéines solubles dans un milieu aqueux et de les concentrer. Cette fraction antigénique liquide est facilement utilisable pour tout type de réaction antigène-anticorps, ce qui élargit les possibilités de détection des anticorps anti *M. pneumoniae* dans les sérums de malades.

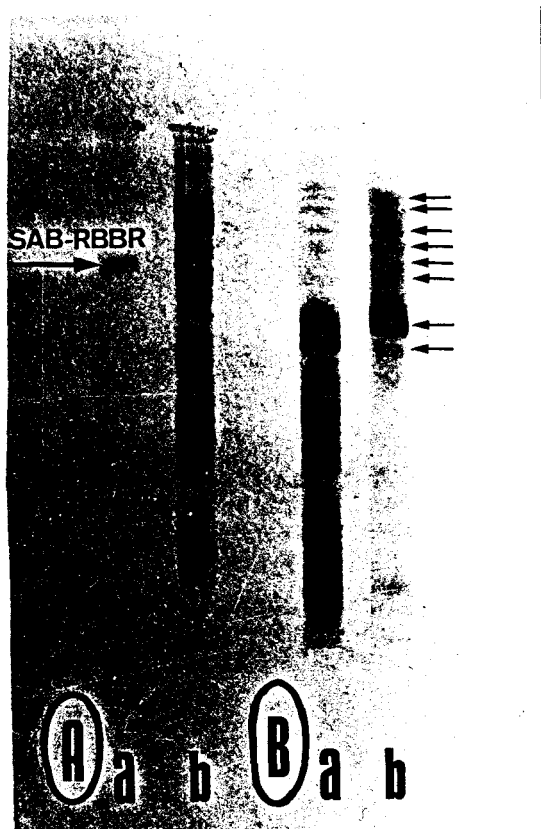


Fig 14 : Elution électrophorétique des protéines membranaires de
M. pneumoniae

A - Localisation des protéines (gel de séparation à 13 % d'acrylamide)

a - gel marqueur : SAB précolorée au RBBR

b - gel préparatif protéines membranaires (fraction membranaire de *M. pneumoniae*)

B - Analyse électrophorétique des protéines éluées (gel de séparation à 7,5 % d'acrylamide)

a - protéines membranaires ;(fraction membranaire de *M. pneumoniae*)

b - protéines lourdes éluées.

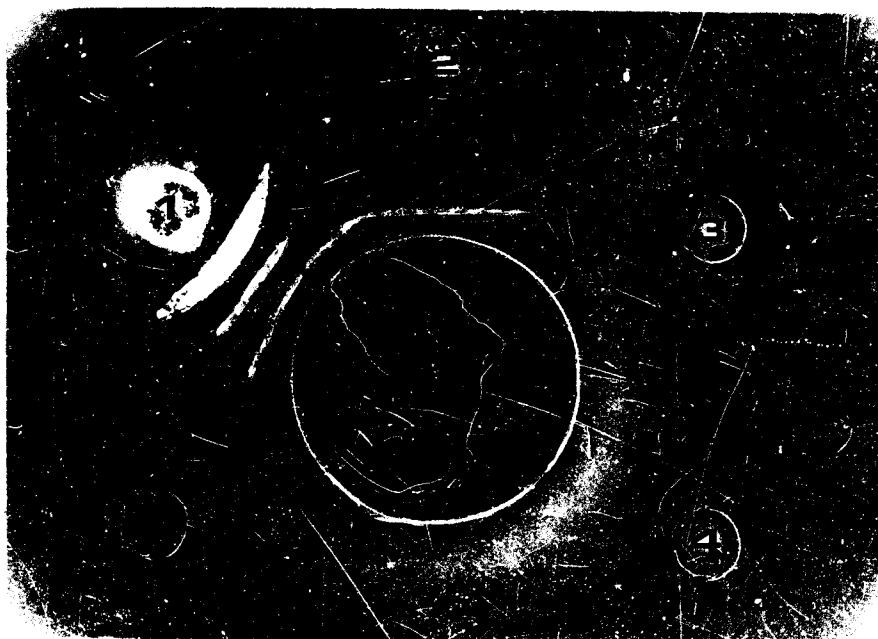


Fig 15 : Réactions de précipitations entre un immusérum de lapin anti membranes de *M. pneumoniae* (cupule centrale) et diverses préparations

- 1 : membranes solubilisées dans du SDS
- 2 : protéines lourdes membranaires de l'éluat
- 3 : Contrôle : milieu de culture
- 4 : Contrôle : tampon d'électroélution

CHAPITRE IV

Mise au point d'une technique
immunoenzymatique pour la recherche
des anticorps anti *Mycoplasma pneumoniae*
à l'aide des antigènes protéiques obtenus



I - INTRODUCTION

Pour la détection des anticorps anti *M. pneumoniae*, plusieurs raisons ont guidé notre choix vers la technique de l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) :

- C'est une méthode aussi sensible que la radioimmunologie. Actuellement seule la néphélométrie laser peut lui être comparable.
- C'est une méthode pratique. L'immunoenzymologie ne nécessite aucun appareillage spécialisé. Sur le plan méthodologique, radioimmunologie et ELISA permettent de doser en série des anticorps en un temps assez court avec une possibilité partielle d'automatisation.

Comme la législation relative à l'emploi des radioéléments est assez restrictive, le grand avantage de l'ELISA par rapport à la radioimmunologie réside dans sa diffusion facile à tous les laboratoires.

- La spécificité est liée à celle de l'antisérum donc comparable à celle de toutes les méthodes immunologiques.

L'immunoenzymologie se caractérise par le marqueur qui permet la reconnaissance de la réaction antigène-anticorps. Le marqueur fixé sur l'antigène ou l'anticorps est une molécule enzymatique qui peut être dosée en général de manière aisée par spectrophotométrie. Les méthodes de dosages immunoenzymatiques ont été suggérées dès 1969 par Avraemas (7), elles dérivent de celles qui ont été imaginées pour la radioimmunologie. Elles sont nombreuses.

Les essais immunoenzymatiques que nous effectuons, utilisent comme

anticorps l'immunsérum de lapin anti membranes de *M. pneumoniae*, comme antigène les protéines membranaires lourdes récupérées antérieurement par élution électrophorétique.

II - PRINCIPE DE LA METHODE

Ici, la substance à doser est un anticorps : anticorps anti membranes de *M. pneumoniae* et nous appliquons une méthode en phase hétérogène non compétitive avec un anti-anticorps marqué. Les méthodes ELISA s'effectuent en milieu hétérogène, elles utilisent un immunoabsorbant ou support.

Dans un premier temps, l'antigène (éluat de protéines) est greffé par adsorption sur des cupules de polystyrène. Après plusieurs lavages permettant d'éliminer l'excès d'antigène, nous ajoutons dans un 2ième temps l'anticorps à doser. De nombreux lavages éliminent les anticorps en solution, puis dans un 3ième temps nous révélons les anticorps fixés à l'antigène par l'addition du conjugué : antisérum anti immunoglobulines de lapin marqué. Le marqueur est un enzyme dont les plus utilisés sont :

- la phosphatase alcaline (*E. coli*)
- la glucose oxydase (*Aspergillus niger*)
- la peroxydase du Raifort (*Horse Radish peroxydase*)
- l'acétylcholinestérase
- la glucoamylase
- la β galactosidase (*E. coli*)
- l'anhydrase carbonique

Après avoir éliminé le conjugué en excès par plusieurs lavages successifs, l'activité enzymatique est mesurée dans les cupules de la microplaque par addition du substrat approprié. Ces différentes étapes sont schématisées sur la figure 16.

Cette technique non compétitive est la plus courante pour la détection et le dosage des anticorps sériques de type Ig G et Ig M pour les divers sérodiagnostics viraux : rubéole, cytomégalovirus, herpès, parasitaires : toxoplasmoses ou bactériens : brucelloses.

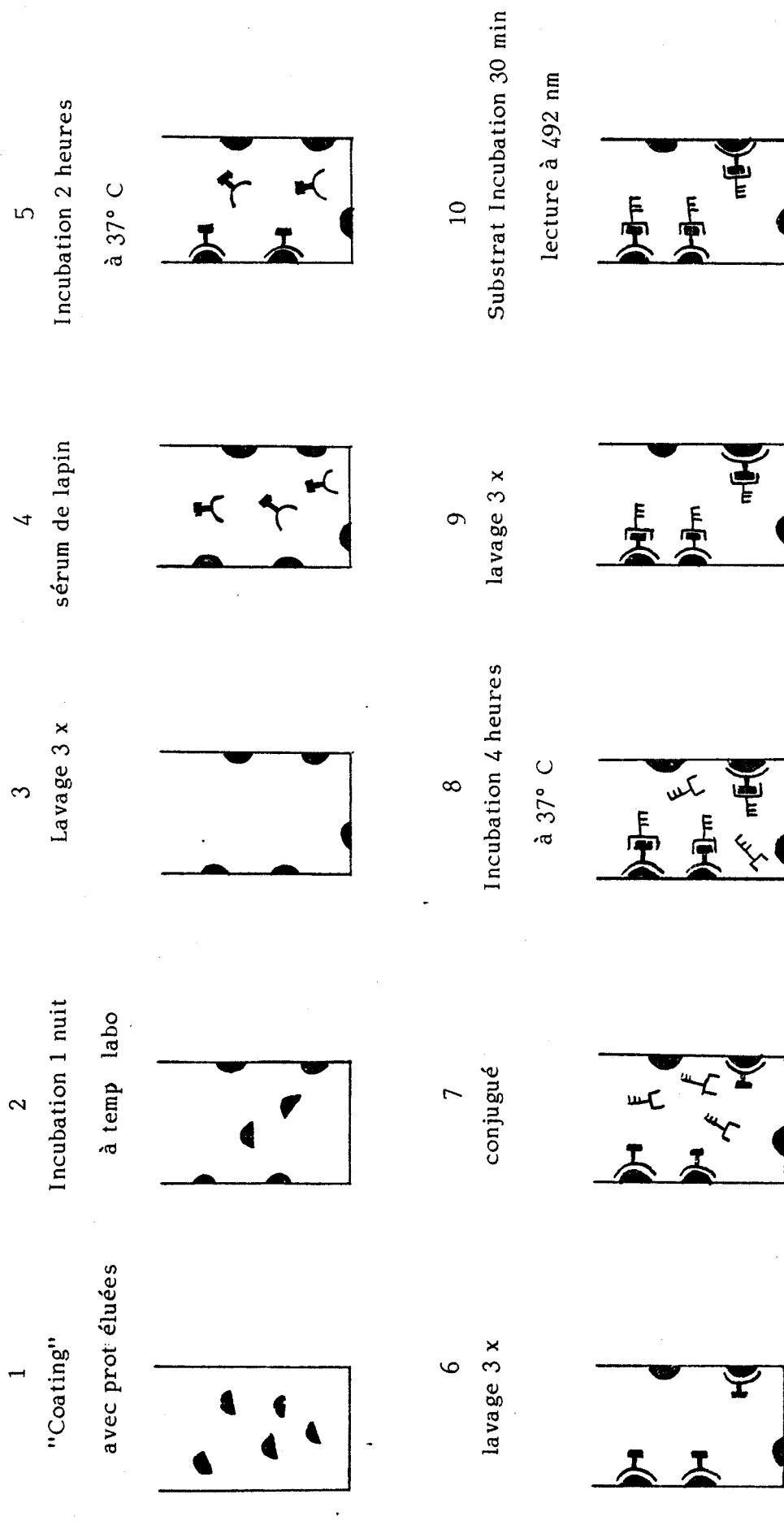
C'est d'ailleurs ce principe qui fut adopté par les quelques auteurs ayant choisi l'ELISA pour le diagnostic indirect des mycoplasmoses (29, 43, 101, 117). Mais leurs travaux utilisaient comme antigène soit une fraction protéique brute (43, 117) soit une suspension de cellules de *M. pneumoniae* (29, 101). Ici la réaction immunoenzymatique est réalisée avec un antigène plus purifié et probablement plus spécifique : les protéines membranaires lourdes dont certaines sont responsables de l'adhésion du microorganisme sur les cellules hôtes.

membranaires de M. pneumoniae

● = Ag (prot éluées)

⌋ = Ac (sérum de lapin)

⌋m = Conjugué



III - MATERIEL ET METHODES

A - Réactifs

1 - Immunoadsorbant ou support

L'immunoadsorbant est l'élément essentiel, il est destiné à être revêtu par l'antigène, ce qui permettra la suite de la réaction. La nature chimique de ce support peut varier considérablement :

- des polysaccharides sous forme de poudre ou de disque (cellulose, dextrane, agarose).

- des polymères, tels que la polyacrilamine, les protéines polymérisées ou le verre. Nous pouvons citer pour exemple le grand développement de la technique de Guesdon et Avraemas (61) : le support est sous forme de billes de polyacrylamide agarose magnétiques, l'usage d'un barreau magnétique permet de séparer les billes de la phase liquide en diminuant ainsi le temps nécessaire à faire de multiples centrifugations.

- le polystyrène dont l'intérêt ne cesse de croître et qui occupe une place privilégiée. L'antigène y est fixé par interactions physiques et non par liaisons covalentes. Néanmoins, le phénomène physique qui régit cette adsorption est mal connu et le greffage de la molécule s'effectue assez empiriquement ce qui entraîne souvent des pertes de sensibilité de la méthode que l'on peut attribuer à un masquage partiel, voire complet, d'un certain nombre de déterminants antigéniques. Malgré cet inconvénient, cette méthode est très employée en raison de sa facilité de réalisation et des performances satisfaisantes

obtenues.

Les supports sont souvent des plaques de microtitration dont les cupules sont à fond plat ou bien des billes plus ou moins grosses, voire des tubes. Nous utiliserons des plaques de microtitration "Serocluster 96 well EIA plate" (Costar Co).

2 - Les antigènes et leur greffage sur le support

L'antigène à greffer est ici constitué des 8 protéines de l'éluat, protéines membranaires chargées négativement par les ions sulfate du SDS. Actuellement, aucun essai de greffage ou "coating" de telles protéines n'a été rapporté dans la littérature.

Contrairement aux autres supports qui nécessitent l'intervention de ligand : substance qui permet l'adhésion de l'antigène sur le support solide, la méthodologie se réduit à une simple mise en contact en milieu aqueux, à pH neutre ou légèrement alcalin. La fixation peut se faire soit à 40°C, soit à température du laboratoire, soit à 37° C : elle sera d'autant plus lente que la température est plus basse. Si nous voulons obtenir une sensibilité importante de la méthode la quantité d'antigène fixé doit être importante. Mais au cours de la réaction, et en particulier au cours des différentes phases de lavage, des quantités variables d'antigène peuvent être désorbées. Toutes ces conditions font qu'il existe des zones de concentration optimale, certaines protéines se fixant mieux que d'autres sans que l'on en connaisse les raisons.

Les concentrations des solutions d'antigènes destinés à être fixés sont le plus souvent de $1\mu\text{g}$ par cupule (117), ou $0,5\mu\text{g}$ (101), plus rarement de $4\mu\text{g}$ (143).

Aussi afin de déterminer la concentration optimale d'antigène à greffer c'est à dire la dilution de travail en antigène, nous étudierons les réponses données par différentes dilutions d'antigène greffé avec un sérum positif et un sérum négatif en anticorps anti *M. pneumoniae* (immunsérums de lapin anti membranes de *M. pneumoniae*) à concentration fixe. Le volume de solution antigénique pour le greffage est de $100\mu\text{l}$ par cupule. La fixation est effectuée à température du laboratoire pendant 14 heures.

3 - Les anticorps

$100\mu\text{l}$ d'immunsérum de lapin anti membrane de *M. pneumoniae* sont ajoutés à chaque cupule après 3 lavages successifs, la liaison antigène-anticorps s'effectue à 37°C pendant 2 heures.

Les immunsérums sont ceux qui ont été utilisés pour l'étude antigénique des protéines électroéluées par réaction d'Ouchterlony (voire page 87).

4 - Le conjugué

Après fixation de l'anticorps et 3 lavages successifs, nous ajoutons $100\mu\text{l}$ de conjugué dans chaque cupule : antisérum de mouton anti immunoglobulines Ig G spécifiques de lapin marqué à la peroxydase de Raifort (Institut Pas-

teur Production Paris).

5 - Le substrat

Après élimination du conjugué en excès par 3 lavages successifs, nous ajoutons 200 μ l de substrat préparé extemporanément :

25 ml de tampon pH 5,5

0,1 M..... phosphate de Na

0,1 M..... acide citrique

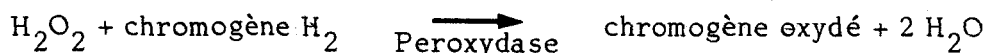
75 mg d'ortho phénylènediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co)

16 μ l de peroxyde d'hydrogène à 30 %

(concentration finale : 3,5 mmole/litre)

Dès addition du substrat, la coloration orange spécifique se développe, elle est progressive. Après 20 minutes à la température du laboratoire la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 100 μ l d'une solution aqueuse d'HCl 5 N et l'absorbance est déterminée au spectrophotomètre à 492 nm.

Le dosage de la peroxydase fait intervenir le peroxyde d'hydrogène qui peut réagir avec de nombreuses substances conduisant à différents types de mesure (107). La méthode à l'ortho phénylène diamine dihydrochloride consiste en une mesure photométrique après réaction d'un chromogène donneur d'hydrogène généralement incolore et qui se transforme par oxydation, en un composé coloré.



C'est la méthode la plus facile à mettre en oeuvre et la plus utilisée. Selon Portsmann (114), la cinétique de la coloration est très complexe et non complètement élucidée : il y aurait une inhibition partielle du substrat causée par un excès de peroxyde d'hydrogène durant la réaction avec le chromogène, et l'action de l'enzyme durant la réaction dépend de la structure et du potentiel rédox du chromogène. Cet auteur a également comparé plusieurs chromogènes pour la détermination de la peroxydase. Lorsque le conjugué est en solution, la sensibilité la plus haute est obtenue avec l'ortho-phénylène diamine.

Les diverses étapes d'additions de réactifs dans les cupules des microplaques sont schématisées sur la figure 16.

B - Matériel

Nous utilisons un appareil spécial pour les réactions ELISA en microplaques : Behring ELISA processor M.

Cet appareil a le grand avantage de laver, ajouter les diverses solutions et lire automatiquement toutes les plaques à différentes longueurs d'onde possibles. Il est relié à un microordinateur qui, programmé pour chaque type de réaction, donnera directement les résultats par rapports aux témoins.

C - Mise au point de la technique

La réaction ELISA fait intervenir 3 paramètres :

- l'antigène,
- l'anticorps,
- le conjugué.

D'abord nous ferons varier les concentrations en antigènes et en conjugué. Ensuite avec des quantités fixes d'antigènes et de conjugué qui donnent les absorbances maximales nous étudierons la sensibilité de la méthode en mesurant les absorbances obtenues par diverses dilutions d'immunsérum anti *M. pneumoniae*.

1 - Détermination de la concentration optimale d'antigène à greffer par cupule et détermination de la dilution optimale du conjugué

1.1 - Antigène

Une gamme de dilutions en antigène de 2 en 2 est effectuée pour le "coating" des cupules. Cette gamme s'étend de 4 µg à 0,062 µg de protéine par cupule. Les concentrations en protéines sont déterminées selon la méthode de Bradford (23, voir annexe technique page 130). Les dilutions d'antigènes sont effectuées dans du tampon phosphate salin PBS pH 7,4 :

- $\text{PO}_4 \text{Na}_2 \text{H}, 12\text{H}_2\text{O}$27 g
- $\text{PO}_4 \text{Na} \text{H}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g
- NaCl..... 8 g
- Eau distillée qsp..... 1 litre

1.2 - Conjugué

3 dilutions de conjugué sont comparées : 1/20 000, 1/10 000, et 1/5 000.

1.3 - Anticorps

Les immunsérums de lapin anti membranaires de *M. pneumoniae* et les immunsérums négatifs sont utilisés à une dilution fixe de 1/10.

Les dilutions de conjugué et d'immunsérum sont effectuées dans du tampon PBS albumineux pH 7,4 :

- $\text{PO}_4 \text{Na}_2\text{H}, 12\text{H}_2\text{O}$27 g
- $\text{PO}_4 \text{NaH}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g
- NaCl..... 8 g
- Sérum albumine bovine..... 10 g
- Eau distillée.....QSP..... 1 litre

Selon Alvarez et coll (2), les molécules d'albumine pourraient s'intercaler sur la paroi de la cupule entre les molécules d'antigènes ce qui reorienterait les molécules protéiques greffées permettant de fixer plus facilement les anticorps de l'immunsérum.

1.4 - Contrôles

Nous effectuons également un "coating" avec du tampon PBS albumineux qui servira de blanc et un "coating" avec du tampon d'électroélution de Laemmli afin de détecter toute interférence dans la réaction antigène-anticorps.

2 - Etude de la sensibilité de la méthode

Afin de déterminer la dilution optimale d'immunsérum donnant une absorbance significative, diverses dilutions en immunsérums sont incubées avec la quantité fixe d'Ag greffé et de conjugué déterminée dans l'expérience précédente.

IV - RESULTATS ET DISCUSSION

A - Greffage de l'antigène sur le support polystyrène

Le tableau 6 montre que :

- malgré leur dénaturation par le SDS, les protéines de l'éluat se greffent correctement sur les parois des cupules en polystyrène.

- les constituants du tampon d'électroélution n'interfèrent pas dans la réaction antigène-anticorps.

Tableau 6 : Réactions immunoenzymatiques obtenues avec diverses substances greffées sur les cupules (méthode non compétitive avec anti anti-corps marqué).

(Substances greffées	(Immunsérum de lapin	(conjugué dilué	(DO à 492 nm
((anti membrane de	(au 1/10 000	(
((M. pneumoniae	((
(Protéines membranai-	(((
(res de M. pneumo-	(+	(+	(2,100
(niae	(((
((((
(Protéines membranai-	(((
(res de M. pneumo-	(-	(+	(0,028
(niae	(((
((((
(PBS albumineux	(+	(+	(0,019
((((
(Tampon d'électroélu-	(+	(+	(0,120
(tion	(((
((((
((((

B - Détermination de la dilution antigénique de travail et de la dilution optimale du conjugué

Les absorbances obtenues à 492 nm sont reportées sur une courbe en fonction de la quantité d'antigène protéique utilisé pour le greffage (fig 17). Les DO obtenues avec un conjugué dilué au 1/5000 sont trop élevées ($DO > 2,200$). Les conditions optimales de travail retenues (DO maximales) sont les suivantes :

- 1 μ g de protéines greffées par cupule (ou quantité de protéines utilisée pour le greffage)
- conjugué dilué au 1/10 000

C - Etude de la sensibilité de la méthode

Selon la figure 18, l'absorbance est maximale pour des dilutions d'immunsérum atteignant 1/400, la dilution 1/3200 donne encore une absorbance significative : $DO = 0,220$. Pour des dilutions supérieures, l'absorbance est très faible et correspond à une adsorption non spécifique des anticorps sur la cupule. Ce même immunsérum présente une réaction positive en fixation du complément pour une dilution beaucoup plus faible (1/256, réactifs CFT Mycoplasmes Behring).

Malgré la grande différence de sensibilité qui existe entre ces deux techniques (1/256 pour la réaction de fixation du complément, 1/3200 pour la réaction ELISA), il est indispensable d'affirmer nos résultats par d'autres expériences : produire un immunsérum dirigé contre les protéines membranaires

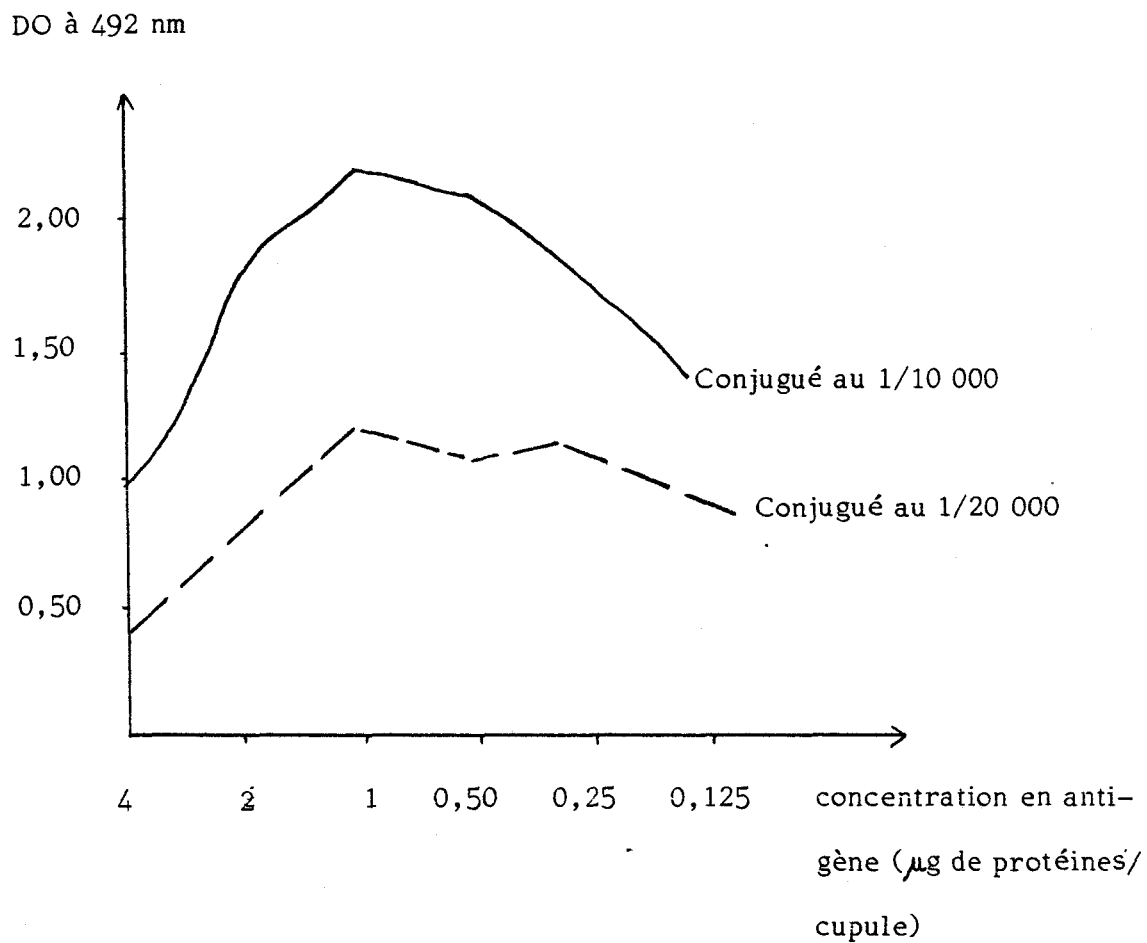


Fig 17 : Absorbances obtenues en fonction de la quantité d'antigène protéique

utilisé pour le greffage

(moyenne de 6 analyses, immunsérum de lapin dilué au 1/10)

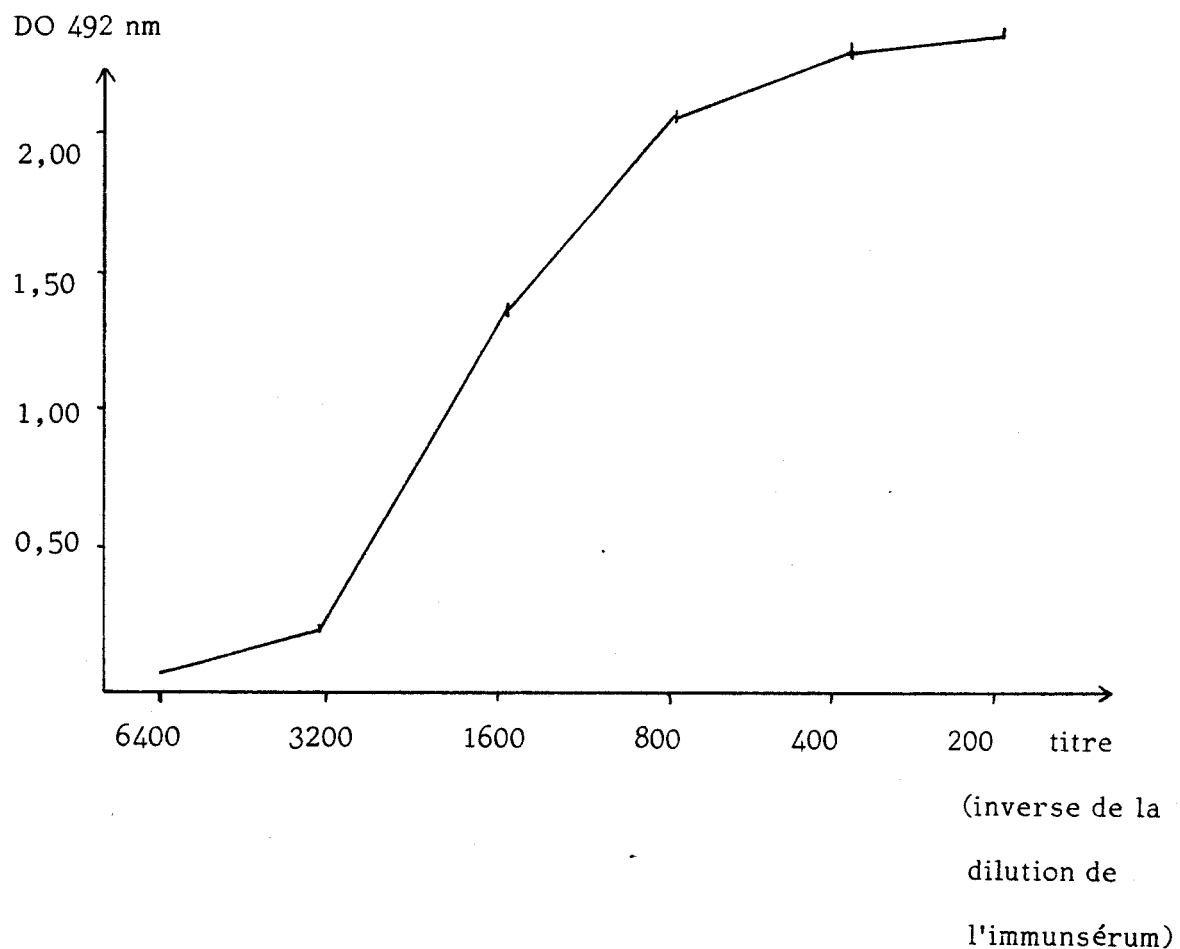


Fig 18 : Absorbances obtenues en fonction de la concentration en immunsérum

(1 μ g de protéines greffées par cupule, conjugué dilué au 1/10 000)

lourdes et le tester contre diverses souches de *M. pneumoniae* et d'autres micro-organismes relativement proches comme les streptocoques afin de démontrer la spécificité antigénique des protéines électroéluées.

Il faut également reconduire nos essais immunoenzymatiques avec des immunsérums humains notamment de patients présentant une infection à *M. pneumoniae* et de patients sains.

D'autre part, la méthode ELISA présente un inconvénient : le fait que le conjugué marqué soit monospécifique (soit anti Ig G, soit Ig M) entraîne un écueil, à savoir : lorsqu'un sérum contient une grande quantité d'Ig M qui sont les premiers anticorps sériques à apparaître après le début d'une infection et peu d'Ig G qui apparaissent plus tardivement, la réaction est négative avec l'anticorps anti Ig G. Ce même sérum présente une réaction de fixation du complément positive, ce procédé détecte la totalité des anticorps. Si on désire éviter ce phénomène de masquage entre Ig G et Ig M, il faut obligatoirement examiner le sérum avec un conjugué marqué anti Ig G et un conjugué marqué anti Ig M. Cela est possible mais long et onéreux. Cependant, un conjugué anti Ig total marqué à la peroxydase pour la toxoplasmose et la rubéole est actuellement à l'étude (108). Par ailleurs nous savons que le facteur rhumatoïde (FR) interfère dans la réaction avec les Ig M et fausse le résultat. Plusieurs auteurs (43, 101) se penchent sur ce problème et essaient de trouver des méthodologies différentes pour éliminer ce phénomène.

Malgré ces inconvénients, la technique ELISA apparaît à l'heure

actuelle comme une technique facile, fiable et réalisable par tous les laboratoires, elle permettra une amélioration importante du diagnostic des mycoplasmoses.

*

*

*

CONCLUSION

Ce travail nous aura permis d'apercevoir la complexité que représente l'extraction d'antigènes membranaires protéiques d'un microorganisme, depuis sa mise en culture jusqu'aux essais antigéniques finaux.

Nous avons d'abord comparé diverses méthodes de lyse de *M. pneumoniae*; une exposition courte aux ultrasons d'une suspension de microorganismes suivie d'une centrifugation différentielle s'est révélée comme un procédé de choix pour la préparation de membranes intactes de *M. pneumoniae*.

Puis l'électrophorèse discontinue en gel de polyacrylamide en présence de SDS accompagnée d'une élution électrophorétique des protéines lourdes nous a permis d'obtenir une solution d'antigènes protéiques membranaires solubles.

Malgré leur dénaturation par le SDS, ces composants membranaires dont plusieurs sont liés directement à la pathogénicité de *M. pneumoniae* ont été utilisés avec succès à la réalisation d'une réaction sérologique de type ELISA.

D'autre part nous n'avons pas recherché à renaturer les protéines éluées, bien que Weber et Kuter (170) aient montré qu'après absorption du SDS des enzymes préalablement dénaturés retrouvaient leur activité biologique. Ceci montre que le déplacement du détergent doit entraîner une réapparition de motifs antigéniques ou épitopes donc une amélioration de la sensibilité des réactions sérologiques. De tels travaux peuvent être envisagés.

Mais l'essentiel réside dans le fait que cette solution de protéines membranaires de *M. pneumoniae* permettra :

- d'améliorer le diagnostic biologique des infections à *M. pneumoniae* par le développement de réactions sérologiques plus spécifiques et plus sensibles.

- de prévoir la mise en évidence directe de *M. pneumoniae* dans les expectorations peu de temps après sa survenue avec des anticorps fluorescents dirigés contre les protéines membranaires isolées.

- d'envisager un nouveau vaccin étant donné l'efficacité limitée des vaccins connus à ce jour.

- de mieux comprendre l'immunité induite par *M. pneumoniae*. La spécificité de l'antigène obtenu remet en question les études épidémiologiques antérieures effectuées avec un haptène de nature glycolipidique et permettra d'établir plus correctement la part de l'immunité humorale et celle d'immunité à médiation cellulaire dans les infections à *M. pneumoniae*.

*

*

*

ANNEXE TECHNIQUE

EVALUATION DE LA CONCENTRATION EN
MYCOPLASMES VIVANTS DES MILIEUX DE CULTURE
PAR LA METHODE DES CFU (Colony Forming Unit)

Méthode de Albers, Fletcher (1) modifiée

I - PRINCIPE

Afin de connaître leurs concentrations en mycoplasmes, les bouillons de culture sontensemencés uniformément sur des milieux de Hayflick gélosés. Après 7 jours d'incubation à 37° C, nous comptons au microscope optique (G x 100) le nombre de colonies. Le nombre de CFU (Colony forming Unit) obtenu pour le volumeensemencé est converti en nombre de CFU/ml.

II - REACTIFS ET MATERIELS

- boîte de pétri de 50 mm de diamètre ayant 10 ml de milieu gélosé,
- étaleurs en verre stériles,
- microscope optique.

III - MODE OPERATOIRE

1) Ensemencement

20 μ l de bouillon sont étalés uniformément sur toute la surface de la gélose avec un étaleur en verre stérile.

2) Incubation

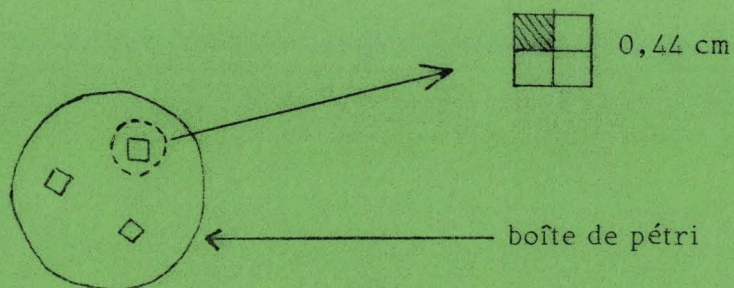
7 jours à 37° C.

3) Comptage des colonies

La surface d'une boîte est égale à $19,62 \text{ cm}^2 = S$.

$$\frac{S}{100} = 0,196 \text{ cm}^2$$

Le 100^{ième} de la surface S est ramené à un carré de 0,44 cm de côté.



Nous traçons plusieurs carrés sur l'ensemble de la surface. Chaque carré est ensuite divisé en 4 parties égales et nous comptons le nombre de CFU dans cette petite surface (carré hachuré) soit x .

Le nombre de colonies est ensuite ramené au nombre par ml.

$$x \times 4 \times 10^2 \times 50 = x \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ CFU/ml}$$

x représente la moyenne de 10 comptages.

DOSAGE DES PROTEINES

SELON LA METHODE DE MARKWELL et coll (98)

I - PRINCIPE

C'est celui de la méthode de Lowry.

Il repose sur la réduction des acides phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin, en présence du complexe formé en milieu alcalin entre les ions Cu^{2+} et les groupements tyrosine et tryptophane des protéines. Il se développe une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle au taux de protéines. L'absorbance est mesurée à 660 nm. La différence réside dans la présence du sodium dodécyl sulfate qui permet la solubilisation des protéines membranaires, donc dans une légère modification des réactifs.

II - REACTIFS1) Solution A

Solution de Na_2CO_3 à 2 % (P/V) dans la soude 0,1 M, contenant 0,16 % (P/V) de tartrate double de Na et de K et 1 % SDS.

2) Solution B

Solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 4 % (P/V) dans de l'eau distillée.

3) Solution C

Solution de travail préparée par un mélange de 100 volumes de solution A et de 1 volume de solution B. Elle se conserve une journée.

4) Réactif de Folin Ciocalteu (Merck)

A diluer au $\frac{1}{2}$ avec de l'eau bidistillée.

5) Etalons de Sérum albumine bovine (Sigma Chemical Co)

Une gamme d'étalonnage de 10 à 200 μg de sérum albumine/ml est réalisée par dilution dans de l'eau distillée d'une solution mère de sérum albumine

bovine titrant 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

III - MODE OPERATOIRE

Dans un tube à hémolyse propre, introduire 1 ml de la solution à doser et 3 ml de la solution C.

Agiter et laisser 10 minutes au moins à température ambiante.

Ajouter ensuite 300 μl de réactif de Folin-Ciocalteu et mélanger immédiatement.

La coloration se développe en 45 minutes à l'obscurité. L'absorbance de la solution est mesurée à 660 nm.

IV - RESULTATS

Une droite d'étalonnage $C = k A$ ($A =$ absorbance, $C =$ concentration) permet de relier directement l'absorbance d'une solution à son taux de protéines exprimé en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

H ₂ O bidistillée.....	30 ml
Pb nitrate.....	1,33 g
Na citrate.....	1,76 g
(Na ₃ C ₆ H ₆ O ₇ H ₂ O)	
mélanger	
NaOH 1N.....	8 ml
mélanger	
H ₂ O bidistillée.....	12 ml

III - MODE OPERATOIRE

1) Fixation (94, 95)

Elle s'effectue en 2 temps

- 1er temps :

0,5 ml d'échantillons sont répartis dans 2 petits tubes en plastic coniques avec couvercle. Après centrifugation, le surnageant est écarté. A chaque culot sont ajoutés :

1 ml solution A

1 ml solution B

1 ml solution C

1 heure à 0° C

Après homogénéisation au vortex et centrifugation le surnageant est écarté.

- 2nd temps :

A chaque culot sont ajoutés :

1 ml solution A

1 ml solution C

1 ml solution D

3 heures à la température du laboratoire.

2) Déshydratation (96)

Après homogénéisation au vortex et centrifugation, les culots subissent une déshydratation selon le procédé suivant :

- addition alcool 70° :

Homogénéisation, 15 minutes de repos et centrifugation.

Manipulation effectuée 2 fois.

- addition alcool 96° :

Homogénéisation, 20 minutes de repos et centrifugation.

Manipulation effectuée 3 fois.

- addition alcool absolu :

Même démarche que précédemment.

- addition d'oxyde de propylène :

Même démarche que précédemment.

3) Inclusion à l'Epon 812 (96)

Sur les culots déshydratés, nous ajoutons une solution à 50 % oxyde de propylène et 50 % résine, (résine = 50 % mélange A + 50 % mélange B)

Ici le temps de contact est variable : soit une nuit à la température du laboratoire, soit une heure à 4° C. Après centrifugation, de la résine et du DMP 30 à raison de 1,5 % sont déposés sur les culots. Après une douce homogénéisation de la solution en évitant de trop déplacer les culots, les échantillons sont polymérisés pendant 3 jours à 60° C.

4) Préparation des sections pour l'observation microscopique

Sur les blocs de résine durcie, nous pratiquons des coupes fines à l'ultramicrotome, qui sont déposées sur des grilles de cuivre nu. Les coupes sont colorées en déposant les grilles (côté coupe dirigé vers le colorant) pendant 90 secondes sur une goutte de colorant de Reynolds. Après un léger rinçage avec de l'eau bidistillée et avoir épongé les grilles sur du papier buvard, les observations sont faites au microscope électronique Jeol 120-CX.

Les grilles peuvent être conservées pour une observation ultérieure.

DOSAGE DES PROTEINES SELON
LA METHODE DE BRADFORD (23)

I - PRINCIPE

Il repose sur la liaison du Coomassie Brilliant blue G 250 à la protéine. Cette liaison stable de 1 minute à 1 heure conduit à un changement de l'absorption du colorant de 465 à 495 nm. Il y a très peu d'interférences avec les cations et les carbohydrates. Seules des quantités relativement grandes (1 %) de détergents comme le SDS ou le Triton X 100 donnent de fausses colorations. Néanmoins, l'interférence causée par de petites quantités de détergents (0,1 %) peut être évitée par l'utilisation de contrôles appropriés.

Cette méthode est un peu plus sensible que celle de Lowry et de plus elle a l'avantage d'être beaucoup plus pratique.

II - REACTIFS

1) Solution de travail

- 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma Chemical Co) dissouts dans 50 ml d'éthanol à 95 %,
- 100 ml d'acide phosphorique à 85 %,
- compléter à 1 litre avec de l'eau bidistillée.

2) Etalons de sérum albumine

A partir d'une solution mère de sérum albumine bovine titrant 100 μ g/ml, une gamme d'étalonnage de 5 à 100 μ g de sérum albumine/ml est réalisée par dilution dans une solution 0,15 M NaCl .

III - MODE OPERATOIRE

Dans un tube à hémolyse propre, introduire 0,1 ml de la solution à

doser (si sa teneur en protéines dépasse $10\ \mu\text{g}$ il suffit de diluer avec la solution $0,15\ \text{M NaCl}$) et $1\ \text{ml}$ de solution de travail.

Agiter, laisser reposer au moins $2\ \text{minutes}$.

L'absorbance à $595\ \text{nm}$ est lue avant $1\ \text{heure}$ contre $1\ \text{blanc}$ ($0,1\ \text{ml}$ de solution $0,15\ \text{M NaCl}$ et $1\ \text{ml}$ de solution de travail).

IV - RESULTAT

Une droite d'étalonnage $C = kA$ ($A = \text{absorbance}$, $C = \text{concentration}$) permet de relier directement l'absorbance d'une solution à son taux de protéines exprimé en $\mu\text{g/ml}$.

PREPARATION DES GELS D'ACRYLAMIDE
POUR ELECTROPHORESE DISCONTINUE
DE LAEMMLI (85)

I - PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE DISCONTINUE DE LAEMMLI

La Technique de Laemmli est une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS). Le mélange de polypeptides migre du gel le plus poreux (gel de concentration dans lequel chaque espèce de polypeptide se concentre dans une zone étroite en bandes minces) vers le gel le moins poreux (gel de séparation dans lequel les diverses bandes de polypeptides se séparent selon leur masse moléculaire). Ce processus s'accompagne d'une modification de pH.

Actuellement, cette méthode est considérée comme l'une des plus appropriées pour l'extraction et la purification des protéines membranaires.

II - REACTIFS

1) Support des gels

Les supports des gels sont des tubes en verre de 105 mm de long, 7 mm de diamètre extérieur et 5 mm de diamètre intérieur.

2) Solution stock d'acrylamide T = 30,8 %

C = 2,7 %

H₂O distillée..... 200 ml

acrylamide..... 60 g

N,N'-méthylène-bisacrylamide..... 1,6 g

Cette solution doit être conservée à 4° C à l'abri de la lumière et toujours être filtrée avant utilisation.

3) Solution stock pour le gel de concentration (ou "stacking gel")

H₂O bidistillée..... 100 ml

Tris..... 6,06 g (0,5 M)

SDS..... 0,4 g

4) Solution stock pour le gel de séparation (ou "separating gel")

H₂O bidistillée..... 100 ml
 Tris..... 18,18 g (1,5 M)
 SDS..... 0,4 g

Les solutions stock sont filtrées et conservées à 4° C.

5) Solution aqueuse à 10 % d'ammonium persulfate

Cette solution est à préparer extemporanément. L'ammonium persulfate en poudre doit être stocké en milieu sec et à l'abri de la lumière.

6) N, N, N', N'- tétraméthyléthylène diamine = TEMED

Ce produit doit être stocké à 4° C.

III - MODE OPERATOIRE

1) Mise en place des tubes en verre

L'extrémité inférieure des tubes est bouchée par du parafilm. Les tubes sont ensuite insérés verticalement dans un portoir adéquat.

2) Coulage du gel de séparation

Le tableau I donne les volumes de solution à utiliser pour des gels à concentrations d'acrylamide différentes.

Tableau I Composition des gels utilisés pour la séparation des protéines
 (pour 50 ml de gel)

(concentration en	:	:	:)
(acrylamide	:	:	:)
(solution	:	7,5 %	10 %	13 %
(:	:	:)
(:	:	:)
(solution stock	:	12 ml	16,2 ml	21 ml
(d'acrylamide	:	:	:)
(:	:	:)
(solution stock pour	:	12,5 ml	12,5 ml	12,5 ml
(gel séparation	:	:	:)
(:	:	:)
(H ₂ O bidistillée	:	24,5 ml	20,3 ml	15,5 ml
(:	:	:)
(:	:	:)
(TEMED	:	50 µl	50 µl	50 µl
(:	:	:)
(:	:	:)

Le pH de ces solutions est ramené à pH 8,8 avec une solution aqueuse HCl 1 N. Après avoir dégazé les solutions, nous ajoutons à 50 ml de gel 0,50 ml de solution aqueuse à 10 % d'ammonium persulfate et nous versons immédiatement cette solution dans les tubes en verre sur une hauteur de 85 mm. Une goutte d'eau est déposée, avec précaution et en évitant tout mélange, au-dessus de la solution de gel pour pallier la formation d'un ménisque lors de la polymérisation qui se fait en 1 heure à température du laboratoire.

Cette goutte d'eau est ensuite éliminée par absorption sur papier filtre.

3) Coulage du gel de concentration

Pour 20 ml de gel de concentration à 4 % d'acrylamide il faut :

- solution stock d'acrylamide..... 2,6 ml
- solution stock pour gel de concentration..... 5 ml
- H₂O bidistillée..... 10,5 ml
- TEMED..... 20 μ l

Le pH de cette solution est ramené à Ph 6,8 avec une solution aqueuse HCl 1 N. Après dégazage et addition de 0,20 ml de solution aqueuse à 10 % d'ammonium persulfate. Chaque tube reçoit 0,26 ml de cette solution (soit sur une hauteur de 10 mm). Comme précédemment, nous ajoutons une goutte d'eau. Après polymérisation, les gels sont prémigrés dans le tampon d'électrophorèse pendant 1 heure sous une intensité constante de 2 mA/gel. Ces gels prémigrés sont stockés à 4° C.

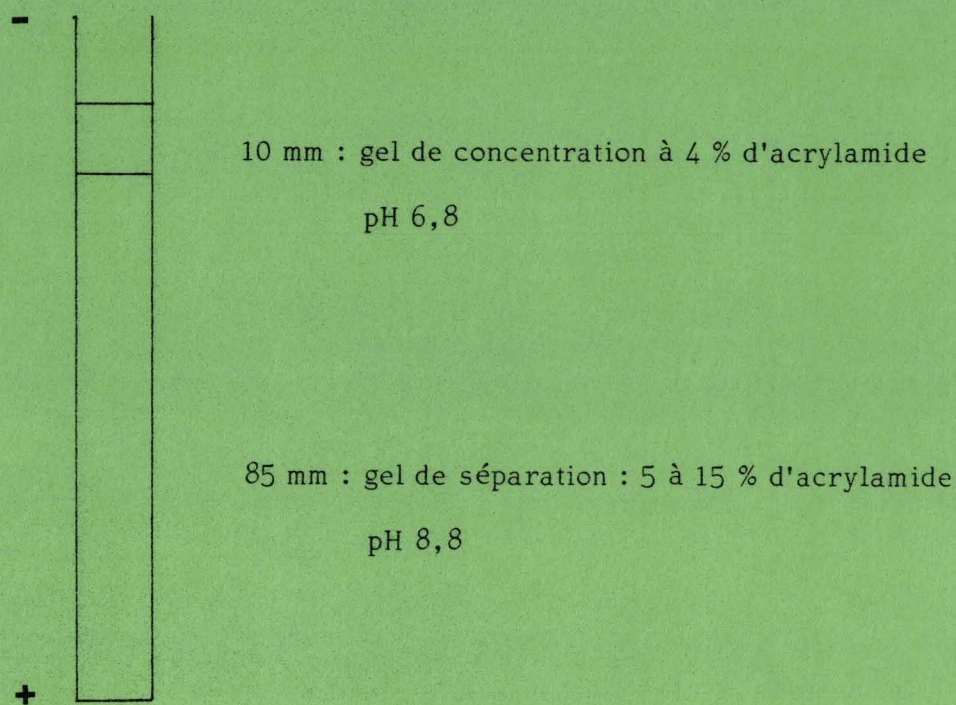


Schéma du dispositif utilisé pour le fractionnement des protéines
membranaires de *Mycoplasma pneumoniae*

PREPARATION DE LA SERUM ALBUMINE
BOVINE PRECOLOREE AU REMAZOL BRILLIANT
BLUE R SELON LA TECHNIQUE DE GRIFFITH (59)

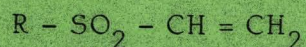
I - PRINCIPE ET INTERET

L'utilisation d'une protéine précolorée au Rémozol Brilliant Blue R (RBBR) permet de localiser les fractions protéiques pendant la migration électrophorétique dans le système Laemmli. Comme la séparation s'effectue selon les différences de masse moléculaire, toutes les protéines ayant une masse moléculaire supérieure à celle de la sérum albumine bovine (SAB, MM = 66 000) précolorée se situent au dessus de cette SAB - RBBR.

Le RBBR se lie covalentiellement à température élevée et à pH 9,2 à certains groupements :

- amines I^{aires} et II^{aires}
- OH
- SH
- carbohydrates...

A pH alcalin, le RBBR est sous la forme :



La liaison entre le colorant et la protéine n'implique aucun changement dans la charge et la masse moléculaire de la SAB.

II - REACTIFS

- sérum albumine bovine : monomère, MM = 66 000
(MW - SDS - 70 : Sigma Chemical Co)
- Remazol Brilliant Blue R (Sigma Chemical Co)
- Solution aqueuse $Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$, 1 M pH 9,2
- Solution aqueuse à 10 % SDS.

III - MODE OPERATOIRE

- Solution A : 2 mg de SAB sont dissous dans 3 ml de solution aqueuse $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 M pH 9,2.

- Solution B : 5 mg de RBBR sont dissous dans 5 ml de solution aqueuse à 10 % SDS.

- A 3 ml de solution A, nous ajoutons 0,5 ml de solution B, ce qui fait un rapport protéine/colorant égal à 4:1 (rapport utilisé par Griffith). Cette solution comporte approximativement $0,6 \mu\text{g}$ de protéine/ μl , elle est portée au bain marie bouillant pendant 5 minutes.

Le RBBR libre est déplacé du mélange par simple dialyse contre une solution aqueuse $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 M pH 9,2 à 4°C pendant une nuit complète.

La solution finale de SAB précolorée est stockée en aliquots à -40°C .

ABSORPTION DES IMMUNSERUMS
DE LAPIN SELON LA TECHNIQUE
DE KAHANE ET RAZIN (79)

I - PRINCIPE

L'immunsérum de lapin anti membranes de *Mycoplasma pneumoniae* présente des anticorps dirigés contre les constituants du milieu de culture. Ces anticorps sont déplacés par absorption de l'immunsérum en présence du milieu de culture suivie d'une centrifugation.

II - MODE OPERATOIRE

A X ml d'immunsérum, nous ajoutons X ml de milieu de culture.

Ce mélange est incubé à 37° C pendant 30 minutes sous agitation permanente, il est ensuite porté à 4° C pendant 1 heure toujours sous agitation. Après 30 minutes de centrifugation à 25 000 g dans une ultracentrifugeuse "Beckman airfuge ultracentrifuge", les surnageants sont récupérés et stockés en aliquots à - 40° C.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALBERS ANN. C., FLETCHER R.D.

Simple method for quantitation of viable mycoplasmas.

Appl. Env. Microbiol, 1982, 43, 958-960

2 - ALVAREZ, HERNANDEZ X., LORIA A.

Antiferritin labeled with the Bolton-Hunter reagent

Clin Chem., 1980, 26, 1916-1916

3 - AMAR A., ROTTEM S., RAZIN S.

Disposition of membrane proteins as affected by changes in the electrochemical gradient across Mycoplasma membranes.

Biochem. Biophys. Res Commun., 1978, 84, 306-312

4 - AMAR A., ROTTEM S., RAZIN S.

Biochim. Biophys. Acta., 1979, 552, 457-467

5 - ARCHER D.B.

Modification of the membrane composition of *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* by the growth medium.

J. Gen. Microbiol., 1975, 88, 329-338

6 - ARCHER D.B.

The structure and functions of the Mycoplasma membranes

Int. Rev. Cytology., 1981, 69, 1-44

7 - AVRAEMAS S.

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldéhyde. Use of the conjugate for the detection of antigen and antibodies.

Immunochemistry, 1969, 6, 43-52

- 8 - BAKA L., BLACK F.T., CHRISTIANSEN C., FREUNDT E.A.
Genome size of mycoplasmal DNA.
Nature (London), 224, 1209-1210

- 9 - BANAI M., RAZIN S., BREDT W., KAHANE I.
Isolation of binding sites to glycophorin from *M. pneumoniae* membranes.
Infect. Immun, 1980, 30, 628-634

- 10 - BASEMAN J.B., COLE R.M., KRAUSE D.C., LEITH D.K.
Molecular basis for cytoadsorption of *M. pneumoniae*.
J. Bacteriol., 1982, 151, 1514-1522

- 11 - BASU S.K., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S.
J. Biol. Chem., 1978, 253, 3852-3856

- 12 - BEBEAR C., LATRILLE J.
Diagnostic biologique de l'infection à *M. pneumoniae*.
Rev. fr. Mal. Resp., 1977, 5, 621-630

- 13 - BEVERS E.M., LEBLANG G., LE GRIMELLE C., OP DEN KAMP J.A.F.,
VAN DEENEN L.L.M.
Disposition of phosphatidylglycerol in metabolizing cells of *Acholeplasma laidlawii*.
FEBS Lett., 1978, 87, 49-51

- 14 - BEVERS E.M., SINGAZ S.A., OP DEN KAMP J.A.F., VAN DEENEN L.L.M.
Recognition of different pools of phosphatidylglycérol in intact cells and isolated
membranes of *Acholeplasma laidlawii* by phospholipase A₂.
Biochemistry, 1977, 16, 1290-1294

15 - BIBERFELD G.

Autoimmune reactions associated with *M. pneumoniae* infection.

Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. Orig. A 245, 144-149, 1979

16 - BIBERFELD G.

Antibodies to brain and other tissues in cases of *M. pneumoniae* infection.

Clin. Exp. Immunol, 1971, 8, 319-332

17 - BIBERFELD G., BIBERFELD P.

Ultrastructural features of *M. pneumoniae*.

J. Bacteriol., 1970, 102, 855-861

18 - BOATMAN E.S., KENNY G.E.

Morphology and ultrastructure of *M. pneumoniae* spherules.

J. Bacteriol., 1971, 106, 1005-1015

19 - BOIVIN P., GALAND C.

Protéines de la membrane erythrocytaire .I. étude électrophorétique des protéines solubilisées des membranes d'érythrocytes humains normaux et pathologiques.

Nouv. Rev. fran. Hémat., 1974, 14, 355-370

20 - BONISSOL C.

Problèmes de diagnostic des pneumopathies à Mycoplasmes.

Rev. fr. Mal. resp., 1975, 5, 649-656

21 - BONISSOL C.

Diagnostic pour l'isolement des mycoplasmes dans les maladies infectieuses.

Laborama, Sept. 1979, 11-14

22 - BOVE J.M., TULLY J.G.

Symposium international 1983 - Pouvoir pathogène des mycoplasmes.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1984, 135.A. n° 1

23 - BRADFORD M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem., 1976, 72, 248-254

24 - BREDT W.

Motility and multiplication of *M. pneumoniae*. A phase contrast study.

Pathol. Microbiol., 1968, 32, 321-326

25 - BRUNNER H.

M. pneumoniae infections.

Israël J. Med. Sci., 1981, 17, 516-523

26 - BRUNNER H., JAMES W.D., HORSWOOD R.L., CHANOCK R.M.

Measurement of *M. pneumoniae* mycoplasma-cidal antibody in human serum.

J. Immunol., 1972, 108, 1491-1500

27 - BRUNNER H., PRESCOTT B., GREENBERG H., JAMES W.D., HORSWOOD R.L., CHANOCK R.M.

Unexpectedly high frequency of antibody to *M. pneumoniae* in human sera as measured by sensitive techniques.

J. Infect. Dis., 1971, 135, 524-530

28 - BRUNNER H., SCHAEG W., BRUCK U., SCHUMMER U., SZIEGOLEIT D., SCHIEFER H.G.

Determination of Ig G, Ig M and Ig A antibodies to *M. pneumoniae* by indirect

staphylococcal radioimmunoassay.

Med. Microbiol. Immunol (Berl), 1978, 165, 29-41

29 - BUSOLO F., TONIN E., CONVENTI L.

Enzyme linked immunosorbent assay for detection of *M. pneumoniae* antibodies.

J. Clin. Microbiol., 1980, 12, 69-73

30 - CARRE J.C., CONDOURET S., CHABANON G., PARAYRE N., DUFRANC P.

Manifestations cardio-pulmonaires des infections par *M. pneumoniae*.

Nouv. Presse Méd., 1978, 7, 2373-2376

31 - CARSON J.L., COLLIER A.M., HU S. S.

Ultrastructural observations on cellular and subcellular aspects of experimental

M. pneumoniae disease.

Infect. Immun., 1980, 29, 1117-1124

32 - CASSEL G.H., COLE B.C.

Mycoplasmas as agents of human disease.

New England J. Med., 1981, 304, 80-89

33 - CHANOCK R.M., BETHESDA M.D., MUFSON M.A., BLOOM H.H., JAMES

W.D., FOX H.H.

Eaton agent pneumonia.

JAMA, 1961, 175, 135-142

34 - CHANOCK R.M., HAYFLICK L., BARILE M.P.

Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and

Its identification as a PPLO.

Proc. Nat. Acad. Sci., 1962, 48, 41-49

- 35 - CHANOCK R.M., JAMES W.D., FOX H.H., TURNER, MUFSON M.A.,
HAYFLICK L.

Growth of Eaton PPLO in broth and preparation of complement fixing Ag.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 110, 884-889

- 36 - CIRILLO V.M., RAZIN S.

Distribution of a phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in Mycoplasmas.

J. Bacteriol., 1973, 113, 212-217

- 37 - CLARK H.W., FOWLER R.C., BROWN T.Mc P.

Preparation of Pleuropneumonia like organisms for microscopic study.

J. Bacteriol., 1961, 81, 500-502

- 38 - CLAVIER J., CHASTEL C., LE GOFF F., KERBRAT G.

Place de *M. pneumoniae* dans l'étiologie des pneumopathies aiguës dites virales.

Rev. fr. Mal. Resp., 1977, 5, 657-660

- 39 - CLYDE W.A.

Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera.

J. of Immunol., 1964, 92, 958-965

- 40 - CLYDE W.A. Jr, HU P.C.

M. pneumoniae infections of man : integration of attachment mechanism, cellular-responses and clinical manifestations.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1984, 135 A, 125-128

41 - CORDERO L., DU V. FLOREY C., HORSTMANN D.

Persistence of antibodies to *M. pneumoniae* following naturally acquired infections.

Am. J. Epidemiol., 1968, 88, 428-436

42 - DE KRUYFF B., WAN DIJCK P.W.A., GOLDBACH R.W., DEMEL R.H.,
VAN DEENEN L.L.M.

Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane bound enzymes in *Acholeplasma laidlawii*.

Biochim biophys. Acta., 1973, 330, 269-282

43 - DUSSAIX E., SLIM A., TOURNIER P.

Comparaison of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test for detection of *M. pneumoniae* antibodies.

J. Clin. Pathol., 1983, 36, 228-232

44 - EFFRATI H., ROTTEM S.S., RAZIN S.

Lipid and protein membrane components associated with cholesterol uptake by mycoplasmas.

Biochim. Biophys. Acta., 1981, 641, 386-394

45 - ENGELMAN D.M.

Lipid bilayer structure in the membrane of *Mycoplasma laidlawii*.

J. Mol. Biol., 1971, 58, 153-165

46 - FAIRBANDS G., STECK T.L., WALLACH D.F.H.

Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.

Biochemistry., 10, 2606-2617, 1971.

47 - FEIZI T., MACLEAN H., SOMMERVILLE R.G., SELWYN J.G.

Studies on an epidemic of respiratory disease caused by *M. pneumoniae*.
Brit. Med. J., 1967, 1, 457-460

48 - FELDMAN H.A., SUHS R.H.

Serologic epidemiologic studies with *M. pneumoniae*. I - Demonstration of an
hemagglutinin and its inhibition by antibody.
Amer. Epid., 1966, 83, 345-356

49 - FELDNER J., BREDT W., KAHANE I.

Influence of cell shape and surface charge on attachment of *M. pneumoniae* to
glass surfaces.
J. Bacteriol., 1983, 153, 1-5

50 - FELDNER J., BREDT W., KAHANE I.

Adherence of red blood cells to *M. pneumoniae*
Infect., 1982, 10, 206-207

51 - FELDNER J., GOBEL U., BREDT W.

M. pneumoniae adhesion localised to tip structure by monoclonal antibody.
Nature, 1982, 298, 765-766

52 - FERNALD G.W.

Pathogenicity of *Mycoplasma* for man, animals, plants and insects.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., 1979, A.245, 139-143

53 - FOY H.M. , ALLAN I.D.

Frequency of *M. pneumoniae* pneumonia

Lancet., Feb. 13, 1982, 392

54 - FOY H.M., KENNY G.E., COONEY M.K., ALLAN I.D.

Long term epidemiology of infections with *M. pneumoniae*

J. Infect. Dis., 139, 681-687

55 - FOY H.M., KENNY G.E., McMAHAN R., MANSY A.M., GRAYSTON J.T.

M. pneumoniae pneumonia in an urban area

JAMA., 1970, 214, 1666-1672

56 - GALE J.L., KENNY G.E.

Complement depending killing of *M. pneumoniae* by antibody : kinetics of the reaction.

J. Immun., 1970, 104 n°5, 1175-1183

57 - GOLDSCHMIDT B., FORTUNATO J., DOWLING P., COOK S.

Rapid detection of acute phase antibodies to cytomegalovirus by counterimmunoelectrophoresis.

Clin. Res., 1975, 23, 587 A (Astr)

58 - GREENBERG A.S., PRESCOTT B.

Sharing of glycolipid antigenic determinants by *M. pneumoniae* vegetables and certain bacteria. Proceedings of the symposium on new approaches for inducing natural immunity to pyogenic organisms.

Symposium on mycoplasma, Winter Park, 1973

59 - GRIFFITH I.P.

Immediate visualization of proteins in dodecyl sulfate-polyacrylamide gels by prestaining with remazol dyes.

Anal. Biochem., 1972, 46, 402-412

60 - GRIFFITHS P.D.

Mucocutaneous reactions during *M. pneumoniae* infection.

Lancet., 6 May 1978, 988

61 - GUESDON J.L., AVRAEMAS S.

Magnetic solid phase enzyme immunoassay.

Immunochem, 1977, 14, 443-447

62 - GUIDICE L., PAVIA R.

Hemadsorption by *M. pneumoniae* and its inhibition with sera from patient with primary atypical pneumonia.

Bact. Proc., 1964, 70-71

63 - HANAOKA F., SHAW J.L., MUELLER G.C.

Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels.

Anal. Biochem., 1979, 99, 170-174

64 - HAYFLICK L.

Tissue cultures and mycoplasmas.

Tex. Rep. Biol. Med., 1965, 23 (suppl 1), 285-303

65 - HERNANDEZ L.A., URQUART G.E.D., DICK W.C.

M. pneumoniae infection and arthritis in man.

Br. Med. J., 1968, 3, 156-157

66 - HOLLINGDALE M.R., LEMCKE R.M.

The antigens of *Mycoplasma hominis* .

J. Hyg. Camb., 1969, 67, 585-605

67 - HU P.C., COLE R.M., HUANG Y.S., GRAHAM J.A., GARDNER D.E.,

COLLIER A.M., CLYDE W.A. Jr.

M. pneumoniae infection : Role of a surface protein in the attachment organelle .

Science, 1982, 216, 313-315

68 - HU P.C., COLLIER A.M., BASEMAN J.B.

Interaction of virulent *M. pneumoniae* with hamster tracheal organ culture .

Infect. Immun., 1980, 30, 628-634

69 - HU P.C., COLLIER A.M., BASEMAN J.B.

Surface parasitism by *M. pneumoniae* of respiratory epithelium .

J. Exp. Med., 1977, 145, 1328-1343

70 - HU P.C., HUANG Y.S., GRAHAM J.A., GARDNER D.E.

Identification of immunogens of *M. pneumoniae* by protein blotting .

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, 103, 1363-1370

71 - HYNES R.O.

Cell surface proteins and malignant transformation .

Biochim. Biophys. Acta., 1976, 458, 73-107

72 - JENSEN K.E.

Measurement of growth-inhibiting antibody for *M. pneumoniae* .

J. Bacteriol, 1963, 86, 1349-1350

73 - JENSEN K.E.

Antibodies to *M. pneumoniae* measured by inhibition of tetrazolium reduction .
Bact. Proc., 1964, p70

74 - JOHANSSON K.E., BLOMQUIST I., HJERTEN S.

Purification of membrane proteins from *Acholeplasma laidlawii* by agarose suspension electrophoresis in tween 20 and polyacrylamide and dextran gel electrophoresis in detergent free media .
J. Biol. Chem., 1975, 250, 2463-2469

75 - JOHANSSON K.E., WROBLEWSKI H.

Crossed immunoelectrophoresis in the presence of tween 20 or sodium deoxycholate, of purified membrane proteins from *Acholeplasma laidlawii* .
J. Bacteriol., 1978, 136, 324-330

76 - JOVER A., MIGUERE J. & coll

Aspects cliniques des infections à *M. pneumoniae* .
Rev. fr. Mal. Resp., 1977, 5, 631-642

77 - KAHANE I., BRUNNER H.

Isolation of a glycoprotein from *M. pneumoniae* membranes .
Infect. Immun., 1977, 18, 273-277

78 - KAHANE I., MARCHESI V.T.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, 225, 38-45

79 - KAHANE I., RAZIN S.

Immunological analysis of *Mycoplasma* membranes .
J. Bacteriol., 1969, 100, 187-194

80 - KENNY G.E.

Serology of mycoplasmic infections in : Rose NR and Friedman H. (Eds),
"Manual of clinical immunology", 2nd edn. 1980, American society of Micro-
biology, Washington DC, 547-552

81 - KENNY G.E., GRAYSTON J.H.

Eaton PPLO complement fixing antigen, extraction with organic solvents.
J. Immunol., 1965, 95, 19-25

82 - KOPELMAN P.

Raised mean cell volume and meningoencephalitis associated with *M. pneumo-*
niae infection.
Br.Med. J., 1977, 1, 881-882

83 - KRAUSE D.C., BASEMAN J.B.

M. pneumoniae proteins that selectively bind to host cells.
Infect. Immun., 1982, 37, 382-386

84 - KRAUSE D.C., LEITH D.K., WILSON R.M., BASEMAN J.B.

Identification of *M. pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and
virulence.
Infect. Immun., 1982, 35, 809-817

85 - LAEMMLI U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage
T4.
Nature, 1970, 227, 680-685

86 - LAMBERT H.P.

Syndrome with joint manifestations in association with *M. pneumoniae* infection
Br. Med. J., 1968, 3, 156-157

87 - LEINIKKI P., PANTZAR P., TYKKÄ H.

Antibody response in patients with acute pancreatitis to *M. pneumoniae*
Scand. J. Gastroent, 1973, 8, 631-635

88 - LEON O., PANOS C.

Long chain fatty acid perturbation in *M. pneumoniae*
J. Bacteriol., 1981, 146, 1124-1134

89 - LEWIS U.J., CLARK M.O.

Preparative methods for disk electrophoresis with special reference to the
isolation of pituitary hormones
Anal. Biochem., 1963, 6, 303-315

90 - LIND K.

Preparation of antigen for the indirect fluorescent antibody test in diagnostic
of *M. pneumoniae* infection
Acta. Path. microbiol. scand. B.78, 149-152

91 - LIU C.

Studies on primary atypical pneumonia I. Localization, isolation and cultivation
of virus in chick embryos
J. Exptl. Med., 1957, 106, 455-466

92 - LOOMES L.M., et coll

Erythrocyte receptors for *M. pneumoniae* are sialyated oligosaccharides of Ii antigene type.

Nature, 1984, 307, 560-563

93 - LOWRY O.H., ROSE BROUGH N.J., FARRA A., RANDAL R.J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275

94 - LUFT J.H.

Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myothendinal junctions.

Proc. -6- Inter Congr - Electr Micr Kyoto, 1966, 2, 65-73

95 - LUFT J.H.

Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification methods of use for electron microscopy and mechanisms of action.

Anat. Rec., 1971, 172, 347-352

96 - LUFT J.H.

Improvements in epoxy resin embedding methods .

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 409-414

97 - MANTZ J.M., et coll

Grippes malignes et pneumopathies à *M. pneumoniae* avec évolution fibrogène .

Rev. fr. Mal. Resp., 1977, 5, 553-564

98 - MARKWELL M.A., HAAS S.M., BIEBER L.L., TOLBERT N.E.

A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples.

Anal. Biochem., 1978, 87, 206-210

99 - MENG K.E., PFISTER R.M.

Intracellular structures of *M. pneumoniae* revealed after membrane removal.

J. Bacteriol., 144, 1980, 390-399

100 - MIGUERES J., JOVER A., JUTEAU B., LEFEBVRE J.C., DIDIER J.,
LARENG M.B.

Les bronchopneumopathies à *M. pneumoniae* de l'adulte.

Rev. fr. Mal. Resp., 1977, 5, 661-664

101 - MIZUTANI H., MIZUTANI H.

Immunologic responses in patients with *M. pneumoniae* infections.

Am. Rev. Respir. Dis., 1983, 127, 175-179

102 - MURRAY H.W., MASUR H., SENTERFIT L.B., et coll

The protean manifestations of *M. pneumoniae* infections and exanthem.

J. Pediatr., 1975, 87, 369-373

103 - NE'EMAN Z., RAZIN S.

Characterization of the mycoplasma membrane proteins V. Release and localization of membrane bound enzymes in *Acholeplasma laidlawii*.

Biochim. Biophys. Acta., 1975, 375, 54-68

104 - NEIMARK H.C.

Extraction of an actin-like protein from the prokaryote *M. pneumoniae* .
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1977, 74, 4041-4045

105 - NEIMARK H.C., LONDON J.

Origin of the Mycoplasmas : Sterol-nonrequiring mycoplasmas. Mycoplasmas evolved from Streptococci .

J. Bacteriol., 1982, 150, 1259-1265

106 - O'CONNELL P.B.H., BRADY C.J.

Polyacrylamide gels with modified cross linkages .

Anal. Biochem., 1976, 76, 63-73

107 - OELLERICH M.

Enzyme immunoassays in clinical chemistry : present status and trends .

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1980, 18, 197-208

108 - PARIS HAMELIN A.

Les méthodes ELISA .

Feuillets de biologie, 1981, XXII n° 118, 41-49

109 - PEROL Y.

Traitement et prophylaxie des infections à *M. pneumoniae* .

Rev. fr. Mal. Resp., 1977, 5, 643-648

110 - PEROL Y., LATRILLE J.

Diagnostic biologique des infections humaines à mycoplasmes .

Med. mal. inf., 1975, 5, 265-276

111 - PLACKETT P., MARMION B.P., SHAW E.J., LEMCKE R.M.

Immunochemical analysis of *M. pneumoniae* 3 - Separation and chemical identification of serologically active lipids.

Aust. J. exp. Biol. med. sci., 1969, 47, 171-195

112 - POLLACK J.D., SOMERSON N.L., SENTERFIT L.B.

Isolation, characterization and immunogenicity of *M. pneumoniae* membranes.

Infect. Immun., 1970, 2, 326-339

113 - PÖNKÄ A.

Arthritides associated with *M. pneumoniae* infection.

Scand. J. Rheumatol., 1979, 8, 27-32

114 - PORTSMANN B.

Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1981, 19, 435-439

115 - PRAKASH G., GABRIDGE M.G.

Influence of the fusogenic agent polyethylene glycol on attachment of *M. pneumoniae* to other cells.

Infect. Immun., 1967, 94, 359-364

116 - PRESCOTT B., SOBESLAVSKY O., CALDES G., CHANOCK R.M.

Isolation and characterization of fractions of *M. pneumoniae* I - Chemical and chromatographic separation

J. Bacteriol., 1966, 91, 2117-2125

- 117 - RÄISÄNEN S.M., SUNI I., LEINIKKI P.
Serological diagnosis of *M. pneumoniae* infection by enzyme immunoassay.
J. Clin. Pathol., 1980, 33, 836-840
- 118 - RAZIN S.
Mycoplasma : the smallest pathogenic procaryotes .
Isr. J. Med. Sci., 1981, 17, 510-515
- 119 - RAZIN S.
The cell membrane of mycoplasma .
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1967, 143, 115-119
- 120 - RAZIN S.
Microbiol Rev., 1978, 42, 414-470
- 121 - RAZIN S.
Osmotic lysis of mycoplasma .
J. Gen. Microbiol., 1963, 33, 471-475
- 122 - RAZIN S.
Factors influencing osmotic fragility of mycoplasma .
J. Gen. Microbiol., 1964, 36, 451-459
- 123 - RAZIN S., ARGAMAN M.
Lysis of *Mycoplasma*, Bacterial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms by various agents.
J. Gen. Microbiol., 1963, 30, 155-172

- 124 - RAZIN S., ARGAMAN M., AVIGAN J.
Chemical composition of Mycoplasma cells and membranes .
J. Gen. Microbiol., 1963, 33, 477-487
- 125 - RAZIN S., BANAI M., GAMLIEL H., POLLIACK A., BREDT W., KAHANE I.
Scanning electron microscopy of Mycoplasmas adhering to erythrocytes .
Infect. Immun., 1980, 30, 538-546
- 126 - RAZIN S., GLASER G., AMIKAM D.
Molecular and biological features of Mollicutes (Mycoplasmas).
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1984, 135A, 9-15
- 127 - RAZIN S., PRESCOTT B., CALDES G., JAMES W.D., CHANOCK R.M.
Role of glycolipids and phosphatidylglycérol in the serological activity of
M. pneumoniae.
Infect. Immun., 1970, 1, 408-416
- 128 - RAZIN S., PRESCOTT B., JAMES W.D., CALDES G., VALDESUSO J.,
CHANOCK R.M.
Production and properties of antisera to membrane glycolipids of M. pneumoniae.
Infect. Immun., 1971, 3, 420-423
- 129 - RENNER E.D., HELMS C.M., JOHNSON W., TSENG C.H.
Coinfections of M. pneumoniae and Legionella pneumophila with Influenza
A virus .
J. Clin. Microbiol., 1983, 17, 146-148
- 130 - REYNOLDS E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron-
microscopy.
J. Cell. Biol., 1963, 17, 208-212

- 131 - ROACH E.B., BENN R.A.V., KAPPAKODA N.K.
Measurement of Ig M antibodies in the diagnosis of Mycoplasma pneumonia.
Pathology, 1980, 12, 519-524
- 132 - RODWELL A.W., PETERSON J.E., SHIRLEY RODWELL E.
Striated fibers of the rho form of Mycoplasma : in vitro reassembly composition,
and structure.
J. Bacteriol., 1975, 122, 1216-1229
- 133 - ROTTEM S., CIRILLO V.P., DE KRUYFF B., SHINITSKY M., RAZIN S.
Correlation of enzymic and transport activities with physical state of lipids in
membranes of M. Mycoides var Capri adapted to grow with low cholesterol
concentrations.
Biochim. Biophys. Acta., 1973, 323, 509-519
- 134 - ROTTEM S., GREENBERG A.S.
Changes in composition, biosynthesis and physical state of membrane lipids
occurring upon aging of Mycoplasma hominis culture.
J. Bacteriol., 1975, 121, 631-639
- 135 - ROTTEM S., LINKER C., WILSON T.H.
Proton motive force across the membrane of Mycoplasma gallisepticum and
its possible role in cell volume regulation.
J. Bacteriol., 1981, 145, 1299-1304
- 136 - ROTTEM S., RAZIN S.
Isolation of mycoplasma membranes by digitonin.
J. Bacteriol., 1972, 110, 699-705

- 137 - ROTTEM S., RAZIN S.
Electrophoretic patterns of membranes proteins of Mycoplasmas.
J. Bacteriol., 1967, 94, 359-364
- 138 - ROTTEM S., RAZIN S., MUHSAM-PELED O.
Acyl carrier protein in Mycoplasmas.
J. Bacteriol., 1973, 113, 586-591
- 139 - ROTTEM S., SLUTZKY G.M., RAZIN S.
Biochemistry., 1978, 17, 2723-2726
- 140 - ROTTEM S., STEIN O., RAZIN S.
Reassembly of Mycoplasma membranes disaggregated by detergents.
Arch. Biochem. Biophys., 1968, 125, 46-56
- 141 - RUDESTOCK U., BREDT W.
Motility of *M. pneumoniae*.
J. Bacteriol., 1977, 129, 1495-1501
- 142 - SAGLIO P., L'HOSPITAL M., LAFLECHE D., DUPONT G., BOVE J.M.,
TULLY J.G., FREUNDT F.A.
Spiroplasma citri, gen and sp, a mycoplasma-like organism associated
with "stubborn" disease of citrus.
J. Syst. Bacteriol. 1973, 23, 191-201
- 143 - SALONEN E.M., VAHERI A.
Immobilization of viral and mycoplasma antigens and of immunoglobulins on
polystyrène surface for immunoassays.
J. Immunol. Methods., 1979, 30, 209-218

144 - SCHIEFER H.G., GERHARDT U., BRUNNER H., KRUPPE M.

Studies with lectins on the surface carbohydrate structure of mycoplasma membranes.

J. Bacteriol., 1974, 120, 81-88

145 - SEQUERA W., JONES E., BRONSON D.M.

M. pneumoniae infection with arthritis and a varicella like eruption.

JAMA, 1981, 246, 1936-1937

146 - SHIRVAN M.H., ROTTEM S., NE'EMAN Z., BITTMAN R.

Isolation of Mycoplasma membranes by dicyclohexylcarbodiimide-induced lysis.

J. Bacteriol., 1982, 149, 1124-1128

147 - SINGER S.J., NICOLSON G.L.

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.

Sciences, 1972, 175, 720-731

148 - SMITH C.B., FRIEDWALD W.T., CHANOCK R.M.

Shedding of M. pneumoniae after tetracycline and erythromycin therapy.

N. Engl. J. Med., 1967, 276, 1172-1175

149 - SMITH P.F.

The composition of membrane lipids and lipopolysaccharides In : Barile MF, Razin S. eds The mycoplasma Vol I

New York : Academic Press 1979

150 - SMITH P.F.

The biology of Mycoplasmas.

Academic Press, New York

151 - SMITH P.F., HERRMANN E.C. Jr.

Possible influence of antibiotic therapy on usefulness of metabolic inhibition test for diagnostic of *M. pneumoniae* infections.

Applied. Microbiol., 1971, 21, 160-161

152 - SMITH P.F., LANG WORTHY T.A., MAYBERRY W.R.

Distribution and composition of lipopolysaccharides from mycoplasmas.

J. Bacteriol., 1976, 125, 916-922

153 - SMITH P.F., WEIR D.M.

Cold agglutinins accompanying *M. pneumoniae* infection.

Br. Med. J., 1981, 282, 1315

154 - SOBESLAVSKY O., PRESCOTT B., CHANOCK R.M.

Adsorption of *M. pneumoniae* to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence.

J. Bacteriol., 1968, 96, 695-705

155 - SOMERSON N.L., WALLS B.E., CHANOCK R.M.

Hemolysin of *M. pneumoniae* : tentative identification as a peroxide.

Science, 1965, 150, 226-227

156 - STALLMAN N.D., ALLAN B.C., WIEMER M.A.

Infections with *M. pneumoniae* : clinical and serological data on 286 patients

Med. J. Aust., 1976, 13 March, 340-343

157 - STECK T.L., FAIRBANKS G., WALLACH D.F.H.

Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection.

Biochemistry, 1971, 10, 2617-2622

158 - STEMKE G.W., ROBERTSON J.A.

Comparison of two methods for enumeration of mycoplasma.

J. Clin. Microbiol., 1982, 16, 959-961

159 - STEPHENS R.E.

High resolution preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : fluorescent visualization and electrophoretic elution-concentration of protein bands.

Anal. Biochem., 1975, 65, 369-379

160 - SUGIYAMA T., SMITH P.F., LANGWORTHY T.A., MAYBERRY W.R.

Immunological analysis of glycolipids and lipopolysaccharides derived from various mycoplasmas.

Infect. Immun., 1974, 10, 1273-1279

161 - SWIFT P.G.F., STEVENS D.W.

Mucocutaneous reactions during *M. pneumoniae* infection.

Lancet, 20 May 1978, 1104-1105

162 - TAS I., DE VRIES A.C.J., BERNDSEN R.G.

A method for the quantitative determination of protein incorporated in solubilizable polyacrylamide gels.

Anal. Biochem., 1979, 100, 264-270

- 163 - TAYLOR-ROBINSON D., SOBESLAWKY O., JENSEN K.E., SENTERFIT
L.B., CHANOCK R.M.
Serologic response to *M. pneumoniae* infection.
Amer. J. Epidem., 1966, 83, 287-297
- 164 - TAYLOR-ROBINSON D., SOMERSON N.L., TURNER H.C., CHANOCK R.M.
Serological relationships among human mycoplasma as shown by complement
fixation and gel diffusion
J. Bacteriol., 1963, 85, 1261-1273
- 165 - TAYLOR-ROBINSON D., PURCELL R.H., WONG D.C., CHANOCK R.M.
A color test for measurement of antibody to certain mycoplasma species based
upon the inhibition of acid production.
J. Hyg. Camb., 1966, 64, 91-104
- 166 - TULLY J.G.
Laboratory diagnosis of *M. pneumoniae* infections,
Isr. J. Med. Sci., 1981, 17, 644-647
- 167 - TULLY J.G., COLE R.M., TAYLOR-ROBINSON D., ROSE D.L.
A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract.
Lancet., 13 June 1981, 1288-1291
- 168 - TULLY J.G., ROSE D.L., WHITCOMB R.F., WENZEL R.P.
Enhanced isolation of *M. pneumoniae* from throat washing with a newly modified
culture medium
J. Infect. Dis., 1979, 139, 478-482

169 - TULLY J.G., WHITCOMB R.F., CLARK H.F., WILLIAMSON D.L.

Pathogenic mycoplasmas : cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma.

Sciences., 1977, 195, 892-894

170 - WEBER K., KUTER D.J.

Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate.

J. Biol. Chem., 1971, 246, 4504-4509

171 - WEINSTEIN M.P., HALL C.B.

M. pneumoniae infection associated with migratory polyarthritides.

Am. J. Dis. Child., 1974, 127, 125-126

172 - WENZEL R.P., CRAVEN R.B., DAVIES J.A., HENDLEY J.O., HAMDRY

B.H., GWALINEY J.M. Jr

Prospective efficacy of an inactivated M. pneumoniae vaccine.

J. Infect. Dis., 1977, 136, 5204-5207

173 - WOESE C.R., MANILOFF J., ZABLEN L.B.

Phylogenetic analysis of the mycoplasma,

Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 494-498

174 - WOODS L.L., SMITH T.F.

Tetrazolium agar overlay in test for M. pneumoniae.

Applied. Microbiol., 1972 July, 148-149

175 - WRAY W., SCULLY C., RENNIE J., MASON D.K.

Major and minor salivary gland swelling in M. pneumoniae infection.

Br. Med. J., 14 June 1980, 1421

176 - WROBLEWSKI H.

Electrophoretic analysis of the arrangement of spiralin and other major proteins in isolated *Spiroplasma citri* cell membranes

J. Bacteriol., 1981, 145, 61-67

177 - ZIOLA B.R., SCRABA D.G.

Recovery of SDS-proteins from polyacrylamide gels by electrophoresis into hydroxylapatite

Anal. Biochem., 1976, 72, 366-371

