




OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25693

To cite this version:

Jouanolou, Lucie . *Mycoplasmoses A M. Agalactiae chez la brebis en lactation : étude du tropisme tissulaire de 2 souches de M. Agalactiae*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2017, 65 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

**« MYCOPLASMOSE A *M. AGALACTIAE* CHEZ LA
BREBIS EN LACTATION : ETUDE DU TROPISME
TISSULAIRE DE 2 SOUCHES DE
M. AGALACTIAE »**

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

JOUANOLOU, Lucie
Née, le 24/02/1989 à PAU (64)

Directeur de thèse : **M. Xavier NOUVEL**

JURY

PRESIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :
M. Xavier NOUVEL
M. Xavier BERTHELOT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

INVITE :
Mme Emilie DORDET-FRISSONI

Chargé de recherches à l'Institut National de Recherche Agronomique de Toulouse

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, Pathologie chirurgicale
Mme **CLAUW Martine**, Pharmacie-Toxicologie
M. **CONCORDET Didier**, Mathématiques, Statistiques, Modélisation
M **DELVERDIER Maxence**, Anatomie Pathologique
M. **ENJALBERT Francis**, Alimentation
M. **FRANC Michel**, Parasitologie et Maladies parasitaires
M. **MILON Alain**, Microbiologie moléculaire
M. **PETIT Claude**, Pharmacie et Toxicologie
M. **SHELCHER François**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, Pathologie infectieuse
M. **BERTHELOT Xavier**, Pathologie de la Reproduction
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, Physiologie et Thérapeutique
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, Pathologie de la Reproduction
M. **DUCOS Alain**, Zootechnie
M. **FOUCRAS Gilles**, Pathologie des ruminants
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie
Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, Pathologie de la reproduction
M. **JACQUIET Philippe**, Parasitologie et Maladies Parasitaires
M. **LEFEBVRE Hervé**, Physiologie et Thérapeutique
M. **LIGNEREUX Yves**, Anatomie
M. **MEYER Gilles**, Pathologie des ruminants
M. **PICAVET Dominique**, Pathologie infectieuse
M. **SANS Pierre**, Productions animales
Mme **TRUMEL Catherine**, Biologie Médicale Animale et Comparée

PROFESSEURS 2° CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, Hygiène et Industrie des aliments
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, Histologie, Anatomie pathologique
M. **BRUGERE Hubert**, Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale
Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, Dermatologie Vétérinaire
M. **GUERRE Philippe**, Pharmacie et Toxicologie
M. **GUERIN Jean-Luc**, Aviculture et pathologie aviaire
Mme **LACROUX Caroline**, Anatomie Pathologique, animaux d'élevage

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, Professeur d'Anglais
M. **SEVERAC Benoît**, Professeur d'Anglais

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, Pathologie de la Reproduction
Mme **BOULLIER Séverine**, Immunologie générale et médicale
Mme **DIQUELOU Armelle**, Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores
M. **DOSSIN Olivier**, Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, Anatomie pathologique
M. **LYAZRHI Faouzi**, Statistiques biologiques et Mathématiques
M. **MAILLARD Renaud**, Pathologie des Ruminants
M. **MATHON Didier**, Pathologie chirurgicale
Mme **MEYNADIER Annabelle**, Alimentation
Mme **PRIYENKO Nathalie**, Alimentation
M. **VERWAERDE Patrick**, Anesthésie, Réanimation

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, Pathologie chirurgicale
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, Physique et Chimie biologiques et médicales
Mme **BIBBAL Delphine**, Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, Biologie cellulaire et moléculaire
Mme **BOUHSIRA Emilie**, Parasitologie, maladies parasitaires
M. **CONCHOU Fabrice**, Imagerie médicale
M. **CORBIERE Fabien**, Pathologie des ruminants
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, Chirurgie Equine
Mme **DANIELS Hélène**, Microbiologie-Pathologie infectieuse
Mme **DEVIERS Alexandra**, Anatomie-Imagerie
M. **DOUET Jean-Yves**, Ophtalmologie vétérinaire et comparée
Mme **FERRAN Aude**, Physiologie
M. **JAEG Jean-Philippe**, Pharmacie et Toxicologie
Mme **LAVOUE Rachel**, Médecine Interne
M. **LE LOC'H Guillaume**, Médecine zoologique et santé de la faune sauvage
M. **LIENARD Emmanuel**, Parasitologie et maladies parasitaires
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, Pathologie Chirurgicale
Mme **MILA Hanna**, Elevage des carnivores domestiques
M. **MOGICATO Giovanni**, Anatomie, Imagerie médicale
M. **NOUVEL Laurent**, Pathologie de la reproduction (en disponibilité)
Mme **PALIERNE Sophie**, Chirurgie des animaux de compagnie
Mme **PAUL Mathilde**, Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins
Mme **PRADIER Sophie**, Médecine interne des équidés
M. **RABOISSON Didier**, Productions animales (ruminants)
M. **VOLMER Romain**, Microbiologie et Infectiologie
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, Production et pathologie porcine

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, Hygiène et industrie des aliments
Mme **LALLEMAND Elodie**, Chirurgie des Equidés
Mme **SABY-CHABAN Claire**, Gestion de la santé des troupeaux bovins



Mise à jour au 01/01/2017

A notre président de thèse,

Monsieur le professeur Jacques IZOPET

Professeur de virologie à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous fait l'honneur d'accepter de présider notre jury de thèse ;

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le docteur Laurent-Xavier NOUVEL

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qu'il reçoive le témoignage de toute ma reconnaissance pour son enseignement, ses conseils, sa disponibilité et son accompagnement dans la réalisation de ce travail.

Monsieur le professeur Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Le remerciant pour son enseignement et pour l'honneur d'accepter d'être jury de thèse.

Madame Emilie Dordet-Frisoni

Chargé de recherche à l'INRA de Toulouse (Institut national de la recherche agronomique)

Pathogénèse des infections à mycoplasmes au sein de l'UMR 1225, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes, INRA, ENVT

Qui nous fait l'honneur d'accepter l'invitation à notre soutenance de thèse.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe du service de pathologie de la reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et à l'équipe Pathogène des infections à mycoplasmes au sein de l'UMR INRA, ENVT Interactions Hôtes-Agents Pathogènes pour leur accueil, leur sympathie et leur aide dans la réalisation de ce travail.

Table des matières

Introduction.....	13
1 Matériels et méthodes.....	17
1.1 Principe de la manipulation expérimentale.....	17
1.2 Organisation de l'expérimentation.....	19
1.3 Animaux.....	20
1.3.1 Description du lot d'animaux.....	20
1.3.2 Conditions d'hébergement des animaux.....	21
1.3.2.1 Type de bâtiment.....	21
1.3.2.2 Alimentation.....	22
1.3.2.3 Soins éventuels des animaux.....	23
1.4 Préparation des inocula et inoculation.....	23
1.4.1 Préparation des inocula.....	23
1.4.2 Inoculation des animaux.....	24
1.5 Suivi clinique.....	25
1.6 Prélèvements ante-mortem.....	25
1.6.1 Prélèvements de sang.....	25
1.6.2 Prélèvements de lait.....	25
1.7 Euthanasie, autopsie et prélèvements post mortem.....	27
1.7.1 Euthanasie.....	27
1.7.2 Autopsie et prélèvements.....	27
1.8 Analyses des prélèvements.....	28
1.8.1 Bactériologie classique.....	28
1.8.2 Bactériologie mycoplasmaïque.....	28
1.8.2.1 Sur les prélèvements de lait.....	28
1.8.2.2 Sur les Prélèvements post-mortem.....	30
1.8.3 PCR.....	30

2	Résultats	31
2.1	Résultats cliniques.....	31
2.1.1	Brebis A	32
2.1.2	Brebis B	33
2.1.3	Brebis C	34
2.1.4	Brebis D	35
2.1.5	Brebis E	36
2.2	Analyses du lait	37
2.2.1	Bactériologie classique	37
2.2.2	Bactériologie spécifique	38
2.2.3	PCR multiplex sur les prélèvements de lait.....	39
2.2	Analyses des prélèvements post-mortem.....	40
2.2.1	Couple Brebis A / Agneau a.....	40
2.2.2	Couple Brebis B / Agneau b.....	42
2.2.3	Couple Brebis C / Agneau c.....	44
2.2.4	Couple Brebis D / Agneau d.....	46
2.2.5	Couple Brebis E / Agneau e.....	48
3.	Discussion	50
3.1	Constitution du lot d'animaux	50
3.2	Durée de l'expérimentation.....	51
3.3	Préparation des inocula et inoculation.....	52
3.3.1	Choix des souches	52
3.3.2	Mode d'inoculation	52
3.3.3	Titre de l'inoculum	53
3.4	Analyses microbiologiques et PCR	53
3.5	Conditions d'hébergement des animaux	54
3.6	Suivi clinique et résultats	54

3.7 Prélèvements de lait et résultats	55
3.8 Prélèvements post-mortem et résultats	56
Conclusion.....	59
Bibliographie.....	61

Liste des figures

Figure 1 - Schéma général du principe de l'expérimentation.....	18
Figure 2- Organisation chronologique de l'expérimentation.....	19
Figure 3 - Logement des brebis (Photographie UMR 1225 IHAP).....	21
Figure 4 – Logement des agneaux (Photographie UMR 1225 IHAP)	22
Figure 5 - Obtention des chimères (Protocole Mycotrop UMR 1225 IHAP)	23
Figure 6 - Protocole de traitement des prélèvements de lait - bactériologie mycoplasmaïque.....	29
Figure 7 - Protocole de traitement des prélèvements post-mortem - bactériologie mycoplasmaïque.....	30
Figure 8 - Résultats Couples Brebis A / Agneau a	41
Figure 9 - Résultats Couples Brebis B / Agneau b	43
Figure 10 - Résultats Couples Brebis C / Agneau c	45
Figure 11 - Résultats Couples Brebis D / Agneau d	47
Figure 12 - Résultats Couples Brebis E / Agneau e	49

Liste des tableaux

Tableau 1 - Organisation d'une semaine type pendant l'expérimentation (Protocole Mycotrop UMR 1225 IHAP).	19
Tableau 2- Prélèvements post-mortem réalisés.	27
Tableau 3 - Résultats cliniques de la brebis A.....	32
Tableau 4 - Résultats cliniques de la brebis B.....	33
Tableau 5 - Résultats cliniques de la brebis C.....	34
Tableau 6 - Résultats cliniques de la brebis D.....	35
Tableau 7 - Résultats cliniques de la brebis E.....	36
Tableau 8 - Résultats de bactériologie classique	37
Tableau 9 - Résultats de bactériologie spécifique réalisée sur le lait des brebis	38

Introduction

L'agalactie contagieuse est un syndrome dû à des mycoplasmes, bactéries de la classe des Mollicutes. Quatre espèces peuvent être responsables de ce syndrome chez les petits ruminants : *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* et *Mycoplasma putrefaciens* (Bergonier et Thiaucourt, 2003). *M. agalactiae* (historiquement le premier décrit) est l'agent le plus fréquemment rencontré chez les ovins. Il fera ici l'objet de notre étude.

L'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* est une mycoplasmosose majeure chez les petits ruminants. Elle est inscrite sur la liste des maladies à notifier auprès de l'Office International des Epizooties (OIE-organisation mondiale de la santé animale) et entraîne des pertes économiques considérables au sein des élevages. Ces pertes peuvent être dues à une baisse voire un arrêt de la production laitière mais aussi à une diminution de l'état général des animaux atteints.

Cette mycoplasmosose est présente dans le monde entier à l'exception de l'Australie et du Royaume-Uni. Elle évolue souvent sous forme d'enzootie. Tous les types d'élevages peuvent être touchés et à ce jour il n'existe aucun moyen de lutte efficace ; elle a donc une importance notable. En France, historiquement elle était présente au sein de 2 zones d'enzootie : la Savoie et les Pyrénées-Atlantiques. En Savoie les cas répertoriés sont de plus en plus rares (les derniers datant de 2002). En revanche, dans les Pyrénées-Atlantiques on assiste à une réelle recrudescence avec une augmentation des foyers depuis 2006 (GDS du département 64). Sur le reste du territoire, les cas d'agalactie contagieuse sont plutôt sporadiques.

Le syndrome d'agalactie contagieuse est caractérisé classiquement par une triple atteinte tissulaire : parenchyme mammaire – tissus articulaire – conjonctive oculaire. Il peut provoquer dans certains cas des signes respiratoires et/ou génitaux. Si la triade clinique (mammaire-articulaire-oculaire) est caractéristique de l'agalactie contagieuse, leur association n'est pas systématique et il n'est pas rare d'observer une seule atteinte tissulaire (l'atteinte mammaire étant la plus fréquente).

Ce syndrome touche particulièrement les femelles en lactation et les jeunes individus. Généralement les femelles tarées et les mâles sont moins atteints (Bergonier et Thiaucourt, 2003). Chez la brebis en lactation l'agalactie contagieuse se traduit

généralement par une atteinte de la mamelle avec des symptômes allant de l'hypogalactie passagère à l'agalactie brutale et totale (Bergonier, 1996). Ces signes cliniques fonctionnels s'accompagnent souvent d'une mammite parenchymateuse avec des foyers d'induration et des nœuds lymphatiques rétro-mammaires réactionnels. Des symptômes oculaires et articulaires ne sont pas exclus mais visibles dans des proportions moindres.

La contamination des troupeaux indemnes a pour origine les troupeaux infectés. Chez la brebis en lactation, les matières virulentes sont essentiellement le lait et le colostrum. L'excrétion du germe peut aussi être observée chez les jeunes, les mâles et les femelles tarées dans les sécrétions nasales, oculaires, auriculaires et génitales (Bergonier et al., 1997). Généralement, l'environnement ne constitue pas un réservoir du fait de la faible résistance des mycoplasmes dans le milieu extérieur. Cependant, un environnement souillé peut permettre la circulation de *Mycoplasma agalactiae* et représenter une source mineure de contamination (Bergonier et al., 1997 ; Bergonier et Berthelot, 2008). Ces nombreuses sources de contamination entretiennent la circulation de l'agent pathogène dans les élevages atteints (contamination horizontale). Les voies respiratoire et mammaire restent les voies de contamination les plus importantes même si d'autres voies sont possibles comme la voie orale, la voie génitale, la voie oculaire et les voies sous-cutanée ou intradermique (Zavagli, 1951).

Des formes asymptomatiques, des formes chroniques ou des formes cliniques avec régression spontanée sont possibles, ce qui complique le dépistage de la maladie. Même si généralement l'association des signes cliniques avec la situation épidémiologique permet d'établir un diagnostic d'agalactie contagieuse, il est recommandé de s'appuyer sur un diagnostic de laboratoire. Compte tenu du tropisme majeur pour la mamelle et de la facilité de prélèvement, le lait reste le prélèvement de choix. D'autres prélèvements peuvent être envisagés comme le liquide synovial, les écouvillonnages auriculaires, oculaires ou nasaux. Cependant, ces prélèvements donnent des résultats inégaux suivant la chronicité ou non de la maladie. Généralement, la recherche de l'agent étiologique sera effectuée par culture et isolement sur milieux spécifiques à partir d'un prélèvement de lait d'animal malade (ou

de lait de tank). D'autres techniques de diagnostic existent : une méthode directe par PCR ou une méthode indirecte par sérologie.

Le traitement de l'agalactie contagieuse est particulièrement difficile du fait de la localisation intracellulaire possible des mycoplasmes et de l'absence de paroi chez ces bactéries. Dans le cas d'une antibiothérapie, les molécules ayant une bonne persistance plasmatique, un tropisme mammaire et une activité sur les bactéries sans paroi seront choisis. Les bêtalactamines ne pourront pas être utilisées. Il reste à disposition les tétracyclines, les macrolides et les quinolones. Généralement le traitement systématique des troupeaux contaminés est conseillé (Bergonier, 1996 ; Bergonier et Berthelot, 2008) mais les résultats sont décevants et la guérison bactériologique n'est quasiment jamais atteinte. Il existe même un risque de favoriser l'accroissement de porteurs asymptomatiques qui entretiennent le cycle de contagiosité dans les élevages (Corrales et al. 2007). En France, il n'existe pas de vaccin pour prévenir l'agalactie contagieuse. Les vaccins testés restent toujours non satisfaisants tant au niveau clinique qu'au niveau de l'excrétion des mycoplasmes dans le lait (Sarris et Papadopoulos, 1989, Leon-Vizcaino *et al.*, 1995, Pépin *et al.*, 2001). Aujourd'hui, la meilleure alternative reste les mesures sanitaires. Cela consiste en l'élaboration de mesures de biosécurité pour limiter la propagation de la maladie et en l'éradication des cheptels positifs.

Les moyens de lutte contre l'agalactie contagieuse sont insuffisants. Il est nécessaire pour les développer de mieux comprendre les mécanismes de la maladie. Les bases moléculaires des tropismes des mycoplasmes ne sont pas connues. Cela pourrait jouer un rôle dans la persistance des infections à mycoplasmes. Dans ce cadre nous voulons étudier le tropisme cellulaire de 2 souches de *Mycoplasma agalactiae* (la souche PG2 et la souche 5632). Dans une étude précédente réalisée avec ces deux souches, il a été montré qu'*in vitro* la souche 5632 a une vitesse de croissance deux fois plus rapide que celle de la souche PG2. Cependant, *in vivo*, lors d'une reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse seule la souche PG2 colonise la mamelle et est excrétée dans le lait alors que la souche 5632 est retrouvée seulement au niveau des nœuds lymphatiques 4 semaines après inoculation. (Amblard, 2016). L'hypothèse que le génome de PG2 contiendrait un ou plusieurs gènes en lien avec le tropisme de la mamelle, lesquels seraient absents ou inactivés

chez la souche 5632 a ainsi pu être avancée. Pour tester cette hypothèse, un protocole expérimental a été élaboré. Il consiste premièrement en la fabrication de génomes chimériques grâce aux techniques de génie génétique (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007 ; Nouvel *et al.*, 2010 ; Dordet-Frisoni *et al.*, 2014). Ces chimères correspondent à des souches de 5632 qui par recombinaison homologue ont intégré dans leur génome des parties de génome de PG2. La totalité du génome de PG2 est représenté parmi les chimères. Ensuite, l'ensemble des chimères accompagnées des 2 souches sauvages témoins ont été inoculées aux animaux. Puis, un suivi clinique et bactériologique a été réalisé afin d'isoler dans le lait des chimères contenant la ou les parties de génome de PG2 responsable(s) du tropisme mammaire.

1 Matériels et méthodes

1.1 Principe de la manipulation expérimentale

Grâce aux méthodes de génie génétique des génomes chimériques ont été obtenus. Un total de 215 chimères 5632[PG2] qui contiennent le génome de 5632 ayant intégré par recombinaison homologue des parties de génome de PG2 (jusqu'à 10%) a été utilisé. L'ensemble des 215 chimères représente la totalité du génome de PG2 (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007 ; Nouvel *et al.*, 2010 ; Dordet-Frisoni *et al.*, 2014).

Ces chimères ont été marquées par des marqueurs de résistance aux antibiotiques (tétracycline et gentamycine) pour pouvoir les isoler et les reconnaître facilement. Ce marquage confère aux souches chimériques la classification d'organismes génétiquement modifiés.

Lors de l'expérimentation, les 215 mycoplasmes chimériques ont été inoculés en quantité égale aux brebis par voie sous cutanée en avant de l'épaule en association avec les souches témoins (la souche PG2 et la souche 5632).

Par la suite, des prélèvements de lait et des analyses microbiologiques ont été réalisés régulièrement pour rechercher l'excrétion dans le lait des chimères et/ou des souches témoins. Ces prélèvements ont été réalisés pendant 5 semaines après inoculation. Les animaux ont été euthanasiés et autopsiés. Des prélèvements (nœuds lymphatiques, poumons) ont été réalisés dans le but de rechercher les différentes souches et les chimères qui pourraient être ré-isolées à ces niveaux.

Dans un deuxième temps, les chimères seront analysées plus précisément pour identifier les régions chromosomiques de PG2 ayant permis la colonisation de la mamelle par 5632.

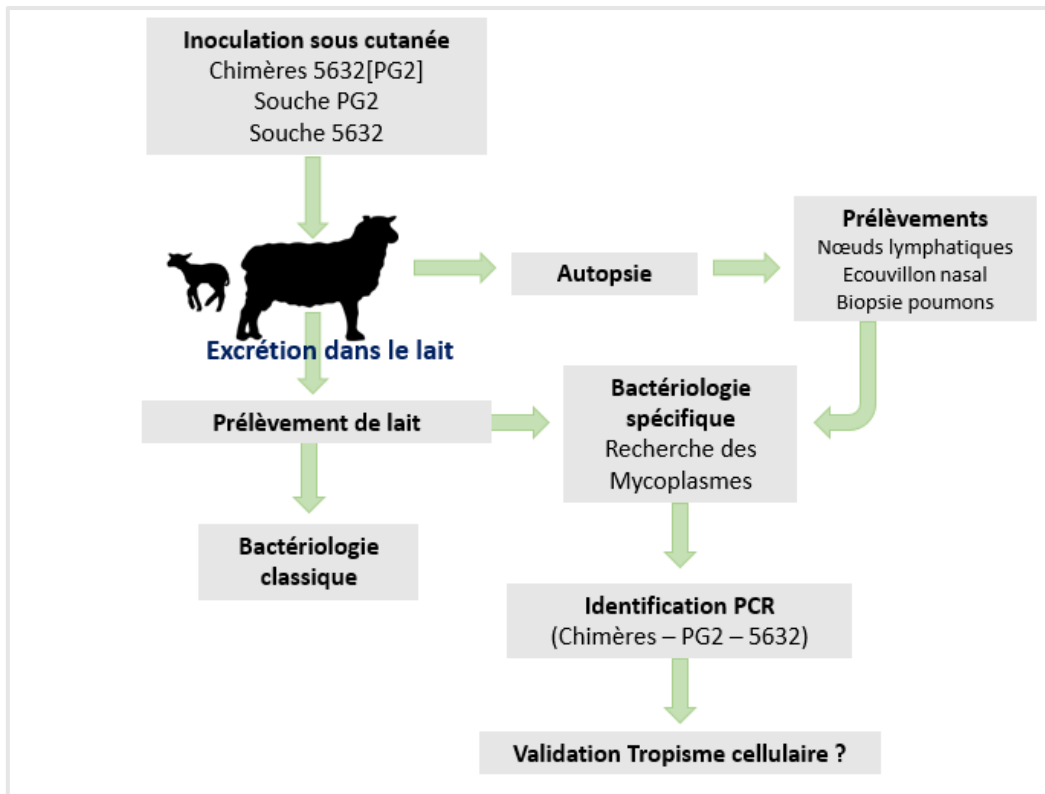


Figure 1 - Schéma général du principe de l'expérimentation

1.2 Organisation de l'expérimentation

La manipulation expérimentale a commencé le 20 octobre 2016 et s'est terminée le 30 novembre 2016. Elle a duré au total 6 semaines.

Frise chronologique des différentes étapes de l'expérimentation :

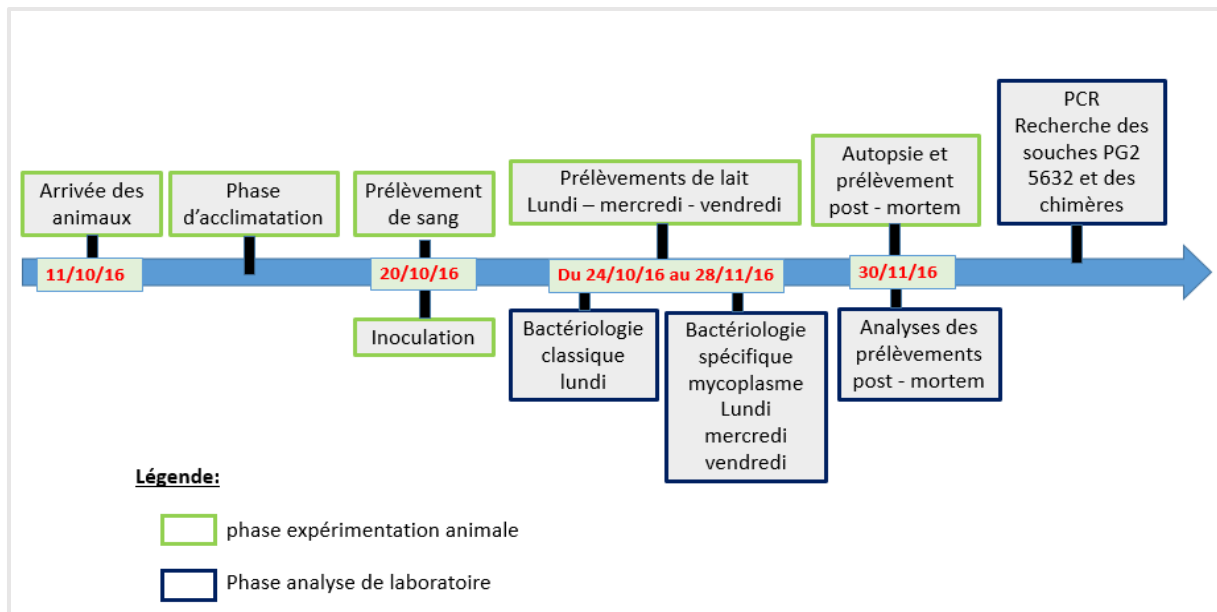


Figure 2- Organisation chronologique de l'expérimentation

Programme d'une semaine type pendant l'expérimentation :

Tableau 1 - Organisation d'une semaine type pendant l'expérimentation (Protocole Mycotrop UMR 1225 IHAP).

Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche
Suivi des animaux	Suivi des animaux	Suivi des animaux	Suivi des animaux	Suivi des animaux	Suivi des animaux	Suivi des animaux
Prélèvement lait n		Prélèvement lait n+1		Prélèvement lait n+2		
Mise en culture Pn (P0 et P0 dil-1)		Mise en culture Pn+1 (P0 et P0 dil-1)		Mise en culture Pn+2 (P0 et P0 dil-1)		
Repiquage Pn-1 (P1 et P1 dil-1)		Repiquage Pn (P1 et P1 dil-1)		Repiquage Pn+1 (P1 et P1 dil-1)		
Dépôt sur boîte Pn-2		Dépôt sur boîte Pn-1		Dépôt sur boîte Pn		
	Lecture boîtes SP4 et SP4GT		Lecture boîtes SP4 et SP4GT			
	Lysats		Lysats			
Bacterio Classique	PCR multiplex		PCR multiplex			

1.3 Animaux

1.3.1 Description du lot d'animaux

Les expérimentations ont été conduites en suivant les règles relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques décrites dans le décret 2013-118 du 1er février 2013. Le protocole expérimental a été validé par le comité d'éthique science et santé animale en août 2016.

Le lot était constitué au départ de 6 brebis primipares croisées Causse du lot et Ile de France en début de lactation et de leurs 6 agneaux. Elles provenaient d'un élevage du Lot, fournisseur d'animaux agréé pour les expérimentations animales.

Les brebis ont agnelé environ 1 mois avant le début des expérimentations, ce qui fait qu'elles se trouvaient au pic de lactation au moment de l'expérience.

Les critères d'inclusion des brebis à cette expérience étaient :

- Critère clinique : absence de symptômes mammaire, oculaire, articulaire ou d'autre symptôme important.
- Critère bactériologique : absence d'infection mammaire, absence d'infection locale ou générale induite par un mollicute.
- Critère Sérologique : séronégativité vis-à-vis de *M. agalactiae*.

Si un animal ne remplissait pas ces critères, il était exclu de l'expérience.

Pendant la phase d'acclimatation, une agnelle, suite à un traumatisme du membre antérieur droit ne pouvait plus se lever toute seule ; il a été décidé de sortir le couple mère-agneau de l'expérimentation. Le lot était donc finalement constitué de 5 brebis suitées en lactation.

Une lettre a été attribuée à chaque brebis pour pouvoir ensuite les repérer et analyser les différents résultats. (Brebis A, brebis B, brebis C, brebis D et brebis E). Les agneaux ont aussi été marqués pour les reconnaître et observer plus facilement le comportement mère-agneau.

1.3.2 Conditions d'hébergement des animaux

1.3.2.1 Type de bâtiment

Pendant toute la durée de l'expérimentation les brebis et les agneaux étaient logés dans un bâtiment d'unité de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Du fait de l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés, un bâtiment de protection de niveau égale ou supérieur à 2 était indispensable. Les animaux ont été logés dans un bâtiment de protection de niveau 3. Dans ce bâtiment, des règles d'hygiène et de biosécurité strictes étaient à respecter : tenue complète dédiée au bâtiment, gants et charlotte. De plus, l'entrée et la sortie de tout matériel étaient régulées de manière stricte.

Les animaux ont évolué dans un box collectif d'environ 25 m² sur caillebotis avec une partie réservée aux agneaux. Un éclairage artificiel était programmé pour respecter un cycle nyctéméral.



Figure 3 - Logement des brebis (Photographie UMR 1225 IHAP)



Figure 4 – Logement des agneaux (Photographie UMR 1225 IHAP)

1.3.2.2 Alimentation

Les brebis étaient nourries matin et soir avec une ration sèche de base à laquelle il été rajouté un complément alimentaire de production azotée et de la paille à volonté. Les agneaux tétaient à volonté le lait de leur mère et avaient à disposition de l'aliment 1^{er} âge dans un premier temps puis 2^{ème} âge dans un second temps. Deux abreuvoirs d'eau étaient à disposition des animaux.

1.3.2.3 Soins éventuels des animaux

A leur arrivée les brebis ont été examinées pour vérifier leur état général. La brebis D présentait une boiterie d'un postérieur. Le sabot a été paré et désinfecté. Un traitement à base d'anti-inflammatoire non stéroïdien (Tolfine®) et d'antibiotiques (Vetrimoxin®) a été réalisé selon la posologie de l'AMM 3 fois à 48 heures d'intervalle.

La brebis A s'est blessée à un antérieur au début de la manipulation, elle a aussi été traitée avec le même protocole que la brebis D. Les 2 brebis se sont rétablies avant la phase d'inoculation et ont pu participer à l'expérimentation.

1.4 Préparation des inocula et inoculation

1.4.1 Préparation des inocula

Les inocula ont été préparés à partir des 2 souches de *Mycoplasma agalactiae* qui avaient été utilisées dans l'étude précédente (Amblard, 2016) : la souche PG2 et la souche 5632.

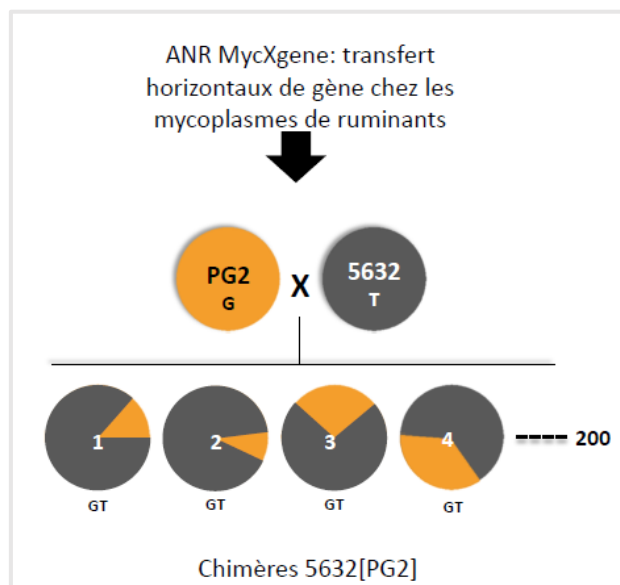


Figure 5 - Obtention des chimères (Protocole Mycotrop UMR 1225 IHAP)

A partir de méthodes de génie génétique, des chimères ont été fabriquées. Cela consiste en des souches de 5632 qui ont intégré par recombinaison homologue des parties du génome de PG2. Sur les 215 chimères obtenues, la totalité du génome de PG2 est représenté (Cf. figure 5 - Obtention de chimères]). Pour permettre de les distinguer des souches témoins, les chimères ont été marquées génétiquement avec deux marqueurs génétiques leur conférant la résistance à la gentamicine et à la tétracycline.

Les inocula préparés à l'avance étaient constitués des 215 chimères en quantité égale et des souches témoins (souche PG2 et souche 5632).

La concentration finale de l'inoculum était de $2 \cdot 10^7$ UFC / mL avec la composition suivante :

- 10^5 UFC / mL de chacune des 215 chimères 5632[PG2]
- 10^5 UFC / mL de la souche 5632
- 10^5 UFC / mL de la souche PG2

Une fois l'inoculum stock préparé, il a été stocké à -80°C jusqu'au jour de l'inoculation.

1.4.2 Inoculation des animaux

Les brebis ont reçu à T0 le 20 Octobre 2016, 2 mL d'inoculum injecté par voie sous cutanée en avant de l'épaule gauche.

1.5 Suivi clinique

Les animaux ont fait l'objet d'un suivi clinique quotidien. Lors de ce suivi, l'état général et l'appétit étaient évalués. Des signes cliniques plus spécifiques liés à l'agalactie contagieuse, à savoir des anomalies de la mamelle, des problèmes articulaires ou des conjonctivites ont été recherchés régulièrement.

Un examen clinique rapproché de la mamelle était réalisé sur chaque brebis les jours de prélèvement, c'est-à-dire 3 fois par semaine. La présence d'un déséquilibre entre les héli-mamelles, d'une chaleur, d'une douleur ou d'une induration du parenchyme mammaire a été objectivée. De plus, systématiquement les nœuds lymphatiques rétro mammaires étaient palpés pour apprécier une éventuelle réaction de ceux-ci. Enfin, l'aspect macroscopique du lait était apprécié lors des premiers jets au moment des prélèvements.

1.6 Prélèvements ante-mortem

1.6.1 Prélèvements de sang

Des prélèvements de sang au niveau de la veine jugulaire ont été réalisés à T0, à T15 et à T30 à raison de 2 tubes secs par brebis. Les sérums ont été stockés. Ils seront notamment utilisés à la fin de la manipulation pour faire des analyses sérologiques.

1.6.2 Prélèvements de lait

Des prélèvements de lait ont été effectués 3 fois par semaine (le lundi – le mercredi – le vendredi) pendant toute la durée de l'expérimentation. Pour ce faire, les agneaux étaient séparés de leurs mères deux heures avant. Les prélèvements ont été réalisés après désinfection du trayon avec de l'alcool et éjection des premiers jets dans

des tubes stériles. Environ 2 mL par trayons été prélevés à chaque fois. L'opérateur changeait de gants entre chaque brebis pour éviter les contaminations entre prélèvements et entre animaux. Les tubes de lait étaient placés à 4°C jusqu'au traitement par le laboratoire.

1.7 Euthanasie, autopsie et prélèvements post mortem

1.7.1 Euthanasie

Les animaux ont été euthanasiés le mercredi 30 novembre 2016 en injectant un euthanasiant (T61®) par voie intraveineuse (4 à 6 mL pour 50kg de poids vif).

1.7.2 Autopsie et prélèvements

Une analyse nécropsique a été réalisée. Plusieurs prélèvements sur les brebis et les agneaux ont été réalisés. Ils sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2- Prélèvements post-mortem réalisés.

	Brebis	Agneaux
Ecouvillons	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nasal (Droit et Gauche) ➤ Auriculaire (Droit et Gauche) ➤ Oculaire (Droit et Gauche) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nasal (Droit et Gauche) ➤ Auriculaire (Droit et Gauche) ➤ Oculaire (Droit et Gauche)
Prélèvements de nœuds lymphatiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rétro mammaire (Droit et Gauche) ➤ Rétro pharyngien (Droit et Gauche) ➤ Médiastinaux ➤ Parotidiens (Droit et Gauche) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rétro pharyngiens (Droit et Gauche mélangés) ➤ Médiastinaux ➤ Tonsilles (Droit et Gauche)
Biopsie	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Poumons 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Poumons
LBA	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Lavage broncho alvéolaire 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Lavage broncho alvéolaire

1.8 Analyses des prélèvements

1.8.1 Bactériologie classique

Une bactériologie classique qui consiste en la culture et en l'isolement de germes (autre que les mycoplasmes) classiquement responsables de mammites chez les ovins, était effectuée une fois par semaine. Le lait était mis en culture sur gélose au sang puis placé à l'étuve à 37°C pendant 24H. Dans le cas où des colonies bactériennes poussaient, une identification d'espèce grâce à des galeries API Biomérieux® était effectuée.

1.8.2 Bactériologie mycoplasmique

1.8.2.1 Sur les prélèvements de lait

Des bactériologies spécifiques pour révéler la présence de mycoplasmes dans le lait ont aussi été réalisées (Damassa et al., 1992).

Cela consistait en plusieurs étapes :

- Ensemencement en milieu liquide spécifique SP4 à des dilutions 1/10 et 1/100 (+ Cobactan + Acétate de Thallium + Gentamycine)
- Incubation à l'étuve à 37°C enrichie en CO₂ pendant 3 jours.
- Repiquage des cultures sur un milieu liquide spécifique SP4.
- Incubation à l'étuve à 37°C enrichie en CO₂ pendant 4 jours.
- Etalement des cultures sur des géloses mycoplasmes (SP4).
- Incubation à l'étuve à 37°C enrichie en CO₂ pendant 4 jours.
- Lecture des boîtes à la loupe binoculaire.

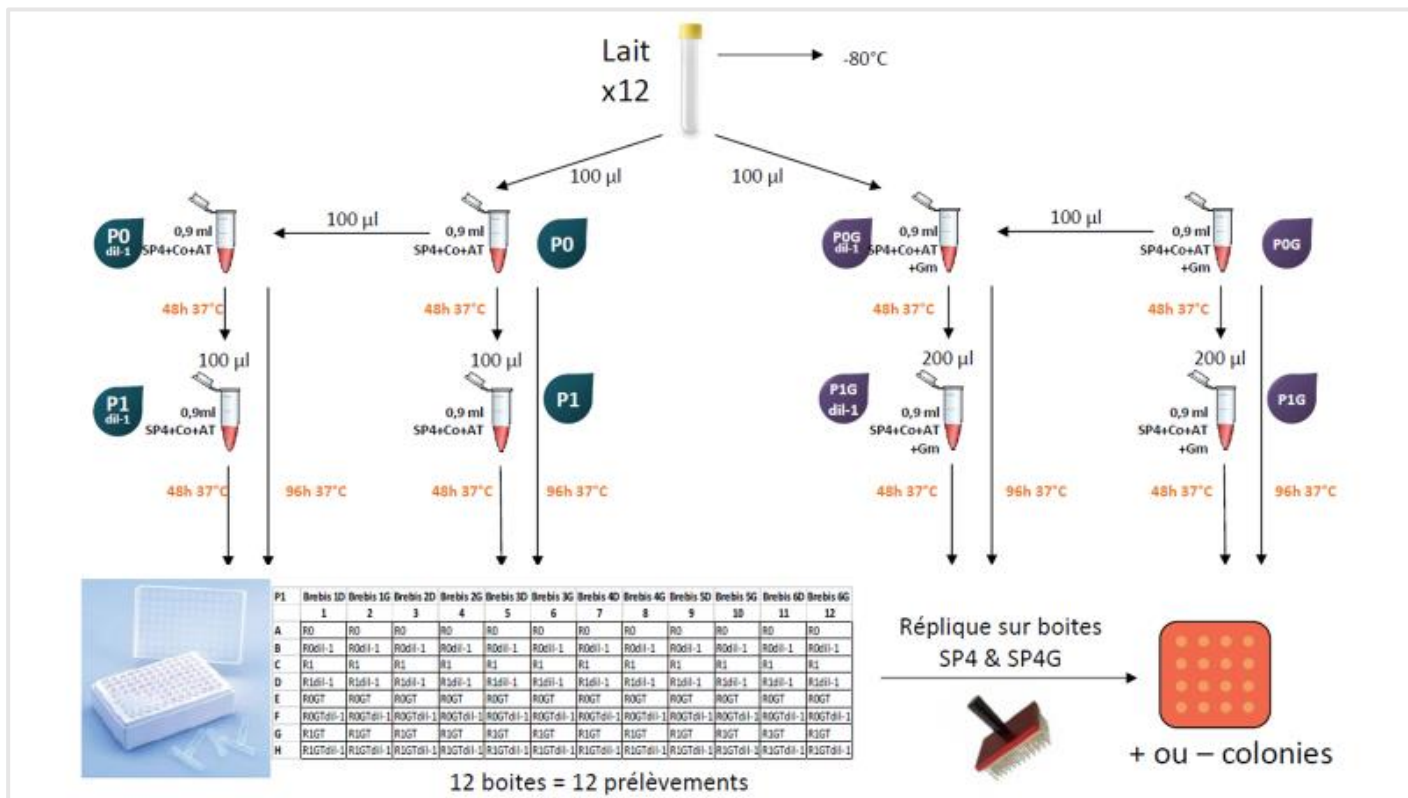


Figure 6 - Protocole de traitement des prélèvements de lait - bactériologie mycoplasmaïque (Protocole Mycotrop UMR 1225 IHAP)

1.8.2.2 Sur les Prélèvements post-mortem

Après l'obtention d'un broyat à partir du morceau d'organe, le même protocole a été mis en place sur les prélèvements post-mortem pour la mise en évidence de mycoplasmes.

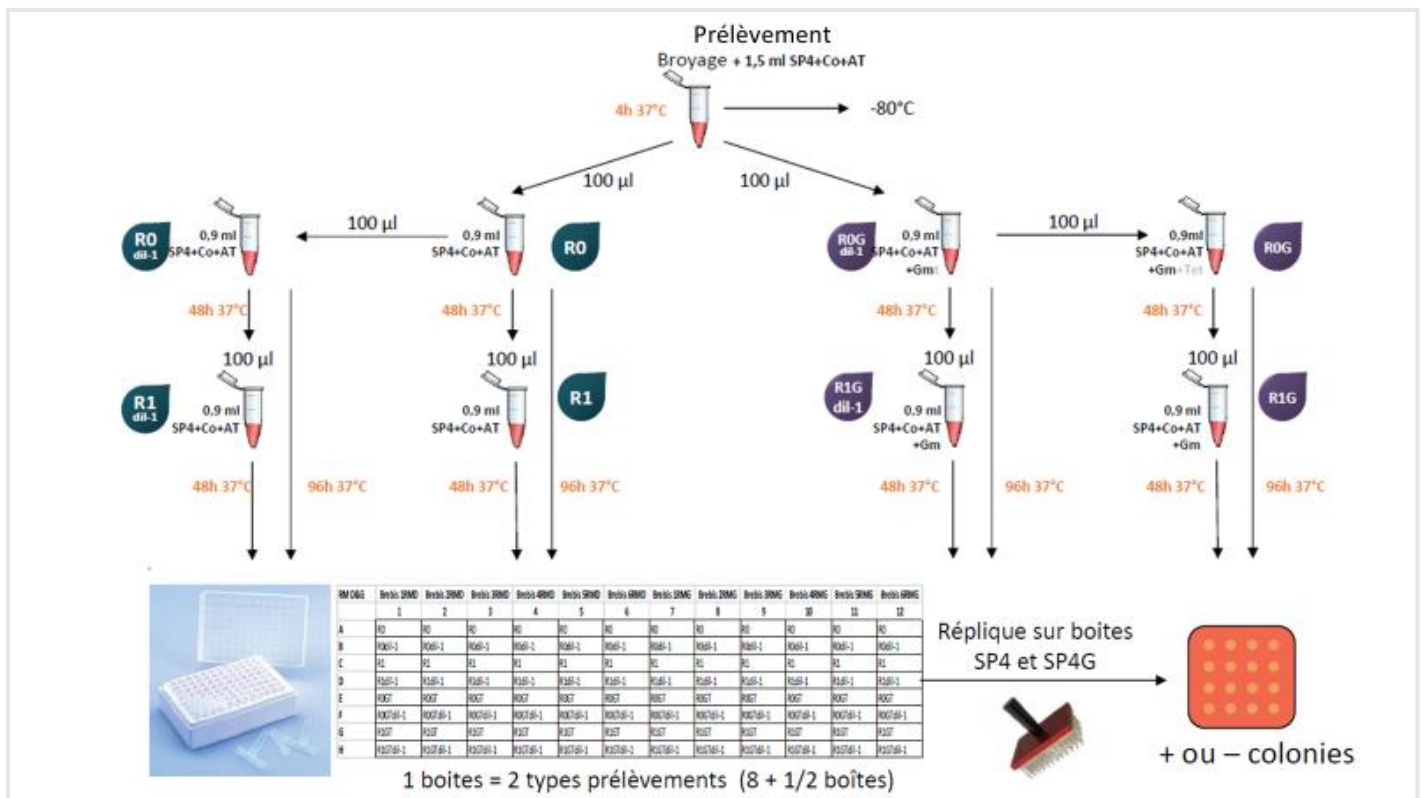


Figure 7 - Protocole de traitement des prélèvements post-mortem - bactériologie mycoplasmaïque (Protocole Mycotrop UMR 1225 IHAP)

1.8.3 PCR

Sur les prélèvements de lait et post mortem positifs en mycoplasmes, des PCR multiplex ont été réalisées pour détecter d'une part les mycoplasmes totaux et d'une autre part les chimères. Cette PCR permet de mettre en évidence : la souche PG2, la souche 5632, les chimères et les Mollicutes (autre que *Mycoplasma agalactiae*).

2 Résultats

2.1 Résultats cliniques

De façon générale, peu de signes cliniques très évocateurs de l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* ont été observés. On peut cependant en noter quelques-uns.

Il a été observé sur toutes les brebis une augmentation d'au moins une articulation du jarret. Les brebis A et E ont eu une augmentation bilatérale à partir de la 5^{ème} semaine post inoculation. Les brebis B, C et D ont eu quant à elles une augmentation unilatérale respectivement à partir de la 7^{ème} semaine, de la 5^{ème} semaine et de la 6^{ème} semaine.

Sur certaines brebis (Brebis B et C) il a été noté une augmentation des nœuds lymphatiques rétro-mammaires à partir de la 6^{ème} semaine post-inoculation.

L'aspect du lait n'a jamais montré d'anomalie tout le long de l'expérimentation mais une diminution légère du volume de lait a été noté chez la brebis C lors de la 7^{ème} semaine.

Tous les résultats cliniques sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

2.1.1 Brebis A

Tableau 3 - Résultats cliniques de la brebis A

	Date	Etape	Critères cliniques								
			Etat général	Appétit	Articulation	Yeux	Mamelle				
							Symétrie	Température	Consistance du parenchyme mammaire	Palpation NL rétro mammaire	Aspect du lait
Semaine	1 Du 11/10/16 au 16/10/16	Acclimatation	B	N	N	N	N	N	Souple - homogène	N	-
	2 Du 17/10/16 au 23/10/16	Inoculation	B	N	Boîte AG ¹	N	N	N	Souple - homogène	N	N
	3 Du 24/10/16 au 30/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple - homogène	N	N
	4 Du 31/10/16 au 06/11/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple - homogène	N	N
	5 Du 7/11/16 au 13/11/16	Prélèvements	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	N	Souple - homogène	N	N
	6 Du 14/11/16 au 20/11/16	Prélèvements	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	Mamelle chaude	Souple - homogène	N	N
	7 Du 21/11/16 au 27/11/16	Prélèvements	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	N	Souple - homogène	N	N
	8 Du 28/11/16 au 3à/11/16	Autopsie	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	N	Souple - homogène	N	N

Légende :

B : Bon

N : Normal

D : Droit

G : Gauche

↗: Volume augmenté

NL : Nœuds lymphatiques

Notes : 1. La brebis s'est coincée le pied de l'antérieur gauche dans le grillage.

2.1.2 Brebis B

Tableau 4 - Résultats cliniques de la brebis B

	Date	Etape	Critères cliniques								
			Etat général	Appétit	Articulation	Yeux	Mamelle				
							Symétrie	Température	Consistance du parenchyme mammaire	Palpation NL rétro mammaire	Aspect du lait
Semaine	1 Du 11/10/16 au 16/10/16	Acclimatation	B	N	N	N	N	N	Souple - homogène	N	-
	2 Du 17/10/16 au 23/10/16	Inoculation	B	N	N	N	N	N	Souple – homogène	N	N
	3 Du 24/10/16 au 30/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple – homogène	N	N
	4 Du 31/10/16 au 06/11/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple – homogène	N	N
	5 Du 7/11/16 au 13/11/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple - homogène	N	N
	6 Du 14/11/16 au 20/11/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Base trayon G induré et douloureux	NL G ↗	N
	7 Du 21/11/16 au 27/11/16	Prélèvements	B	N	Jarret G ↗	N	N	N	Souple - homogène	NL G ↗	N
	8 Du 28/11/16 au 3à/11/16	Autopsie	B	N	Jarret G ↗	N	N	N	Souple - homogène	NL G ↗	N

Légende :

B : Bon

N : Normal

D : Droit

G : Gauche

↗ : Volume augmenté

NL : Nœuds lymphatiques

2.1.3 Brebis C

Tableau 5 - Résultats cliniques de la brebis C

	Date		Etape	Critères cliniques								
				Etat général	Appétit	Articulation	Yeux	Mamelle				
								Symétrie	Température	Consistance du parenchyme mammaire	Palpation NL rétro mammaire	Aspect du lait
Semaine	1	Du 11/10/16 au 16/10/16	Acclimatation	B	N	Déformation canon G ¹	N	N	N	Dur-Homogène	N	N
	2	Du 17/10/16 au 23/10/16	Inoculation	B	N	N	N	N	N	Dur - Homogène	N	N
	3	Du 24/10/16 au 30/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Dur - Homogène	N	N
	4	Du 31/10/16 au 06/11/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Dur - Homogène	N	N
	5	Du 7/11/16 au 13/11/16	Prélèvements	B Ecoulement nasal à G ²	N	Jarret D ↗	N	N	Mamelle chaude ₃	Dur - Homogène	N	N
	6	Du 14/11/16 au 20/11/16	Prélèvements	B	N	Jarret D ↗	N	N	Mamelle chaude	Dur - Homogène	NL G ↗	N
	7	Du 21/11/16 au 27/11/16	Prélèvements	B	N	Jarret D ↗	N	N	Mamelle chaude	Dur - Homogène	NL G ↗	↘ V
	8	Du 28/11/16 au 3à/11/16	Autopsie	B	N	Jarret D ↗	N	N	Mamelle chaude	Dur - Homogène	NL G ↗	N

Légende :

B : Bon

N : Normal

D : Droit

G : Gauche

↗ : Volume augmenté

NL : Nœuds lymphatiques

Notes :

1. Déformation du canon due à une fracture ancienne.
2. Jetage unilatéral à Gauche translucide séreux.
3. Température rectale = 39,7°C.

2.1.4 Brebis D

Tableau 6 - Résultats cliniques de la brebis D

	Date		Etape	Critères cliniques								
				Etat général	Appétit	Articulation	Yeux	Mamelle				
								Symétrie	Température	Consistance du parenchyme mammaire	Palpation NL rétro mammaire	Aspect du lait
Semaine	1	Du 11/10/16 au 16/10/16	Acclimatation	B	N	N	N	N	N	Souple - Homogène	N	N
	2	Du 17/10/16 au 23/10/16	Inoculation	B	N	N	N	N	N	Souple - Homogène	N	N
	3	Du 24/10/16 au 30/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	Hémi mamelle G ↘	N	Souple - Homogène	N	N
	4	Du 31/10/16 au 06/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple - Homogène	N	N
	5	Du 7/11/16 au 13/11/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	Souple - Homogène	N	N
	6	Du 14/11/16 au 20/11/16	Prélèvements	B	N	Jarret D ↗	N	N	N	Souple - Homogène	N	N
	7	Du 21/11/16 au 27/11/16	Prélèvements 1	B	N	Jarret D ↗	N	N	N	Souple - Homogène	N	N
	8	Du 28/11/16 au 3à/11/16	Autopsie	B	N	Jarret D ↗	N	N	N	Souple - Homogène	N	N

Légende :

B : Bon

N : Normal

D : Droit

G : Gauche

↗ : Volume augmenté

↘ : Volume diminué

NL : Nœuds lymphatiques

Notes : 1. Agneau retrouvé mort accidentellement dans la cage.

2.1.5 Brebis E

Tableau 7 - Résultats cliniques de la brebis E

	Date		Etape	Critères cliniques								
				Etat général	Appétit	Articulation	Yeux	Mamelle				
								Symétrie	Température	Consistance du parenchyme	Palpation NL rétro mammaire	Aspect du lait
Semaine	1	Du 11/10/16 au 16/10/16	Acclimatation	B	N	N	N	N	N	N	N	-
	2	Du 17/10/16 au 23/10/16	Inoculation	B	N	N	N	N	N	N	N	N
	3	Du 24/10/16 au 30/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	Du 31/10/16 au 06/10/16	Prélèvements	B	N	N	N	N	N	N	N	N
	5	Du 7/11/16 au 13/11/16	Prélèvements	B	N	Jarret G ↗	N	N	N	N	N	N
	6	Du 14/11/16 au 20/11/16	Prélèvements	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	N	N	N	N
	7	Du 21/11/16 au 27/11/16	Prélèvements	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	N	N	N	N
	8	Du 28/11/16 au 3a/11/16	Autopsie	B	N	Jarrets D et G ↗	N	N	N	N	N	N

Légende :

B : Bon

N : Normal

D : Droit

G : Gauche

↗ : Volume augmenté

↘ : Volume diminué

NL : Nœuds lymphatiques

2.2 Analyses du lait

2.1.1 Bactériologie classique

Les résultats de microbiologie ont montré que la brebis B était contaminée au niveau de l'hémi-mamelle droite par un Staphylocoque à coagulase négative depuis le début et cette infection a persisté tout le long de la manipulation. Les brebis C et D ont eu 2 infections ponctuelles d'une hémi-mamelle (respectivement le 24 octobre 2016 et le 31 octobre 2016). Les autres brebis A et E quant à elles, n'ont jamais eu d'infection de la mamelle par des germes classiquement responsables de mammites chez les petits ruminants.

Les résultats de recherche de germes classiquement responsables de mammites chez les petits ruminants sont présentés dans le tableau ci-dessous (Cf. tableau 8).

Tableau 8 - Résultats de bactériologie classique

Date des Prélèvements	Brebis A		Brebis B		Brebis C		Brebis D		Brebis E	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
20.10.16	C	0	0	SCN	0	0	0	0	0	0
24.10.16	0	0	0	SCN	0	SCN	0	0	0	0
31.10.16	0	0	0	SCN	0	C	SCN	0	0	0
07.11.16	0	0	0	SCN	0	0	0	0	0	0
14.11.16	0	0	0	SCN	0	0	0	0	0	0
21.11.16	0	0	0	SCN	0	C	0	0	0	0
28.11.16	0	0	0	SCN	0	0	0	0	0	0

Légende :

G : hémi-mamelle gauche

D : hémi-mamelle droite

0 : absence de colonie bactérienne

SCN : Staphylocoque à coagulase négative

2.1.2 Bactériologie spécifique

Les analyses microbiologiques ont montré que les brebis A, D et E n'ont jamais excrété de mycoplasme dans le lait pendant toute la durée de l'expérimentation. En revanche les autres brebis (B et C) ont excrété des mycoplasmes dans le lait de façon transitoire ou continue suivant les individus (Cf. Tableau 9).

La brebis B a eu une excrétion ponctuelle à droite et à gauche le 18 novembre 2016. La brebis C quant à elle a excrété de façon plus continue des mycoplasmes dans le lait : au niveau de l'hémi-mamelle gauche elle a excrété des mycoplasmes à partir du 4 novembre 2016 jusqu'à la fin de l'expérimentation et au niveau de l'hémi-mamelle droite elle a excrété de façon transitoire et discontinue des mycoplasmes à partir du 11 novembre 2016 jusqu'au 25 novembre 2016 (Cf. Tableau 9).

Tableau 9 - Résultats de bactériologie spécifique réalisée sur le lait des brebis

semaine	Hémi-mamelle	Brebis A		Brebis B		Brebis C		Brebis D		Brebis E	
		Gauche	Droite	Gauche	Droite	Gauche	Droite	Gauche	Droite	Gauche	Droite
S1 post - inoculation	24/10/16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	26/10/16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	28/10/16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S2 post - inoculation	31/10/16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	02/11/16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	04/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
S3 post - inoculation	07/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	09/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	11/11/16	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N
S4 post - inoculation	14/11/16	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N
	16/11/16	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N
	18/11/16	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N
S5 post - inoculation	21/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	23/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	25/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
S6 post - inoculation	28/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	30/11/16	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N

Légende :

N : culture de mycoplasmes négative sur milieu SP4 sans Gentamicine

P : culture de mycoplasmes positive sur milieu SP4 sans Gentamicine

2.1.3 PCR multiplex sur les prélèvements de lait

Toutes les cultures de lait positives en mycoplasmes ont été analysées par PCR multiplex. Cette analyse révèle que pour la brebis C comme pour la brebis B, l'unique souche de mycoplasmes retrouvée dans le lait est la souche PG2.

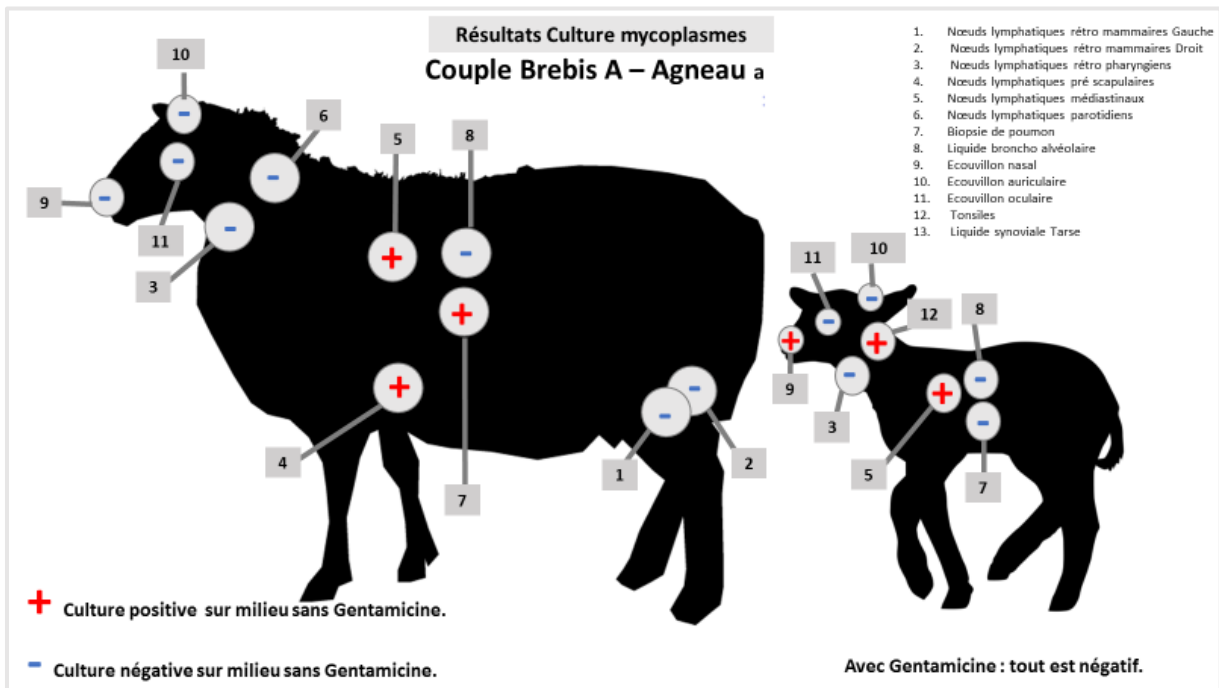
2.2 Analyses des prélèvements post-mortem

2.2.1 Couple Brebis A / Agneau a

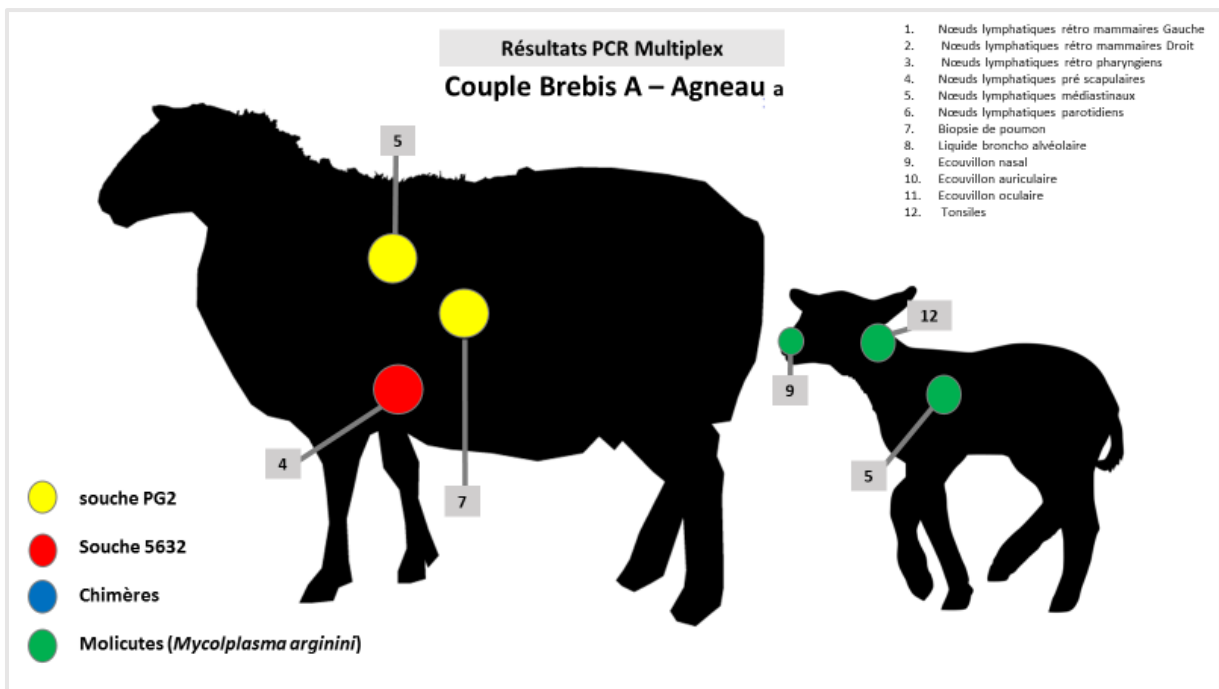
Grâce aux analyses microbiologiques post-mortem sur la brebis A, il a été montré que des mycoplasmes ont colonisés les nœuds lymphatiques pré-scapulaires, les nœuds lymphatiques médiastinaux et le parenchyme pulmonaire. En revanche les autres prélèvements étaient tous négatifs. Des mycoplasmes ont été retrouvés sur l'agneau a au niveau des cavités nasales, des tonsilles et des nœuds lymphatiques médiastinaux. (Cf. Figure 8A).

La PCR multiplex a permis de montrer qu'au niveau des nœuds lymphatiques pré-scapulaires, c'est la souche 5632 qui est présente et en revanche au niveau des nœuds lymphatiques médiastinaux et du parenchyme pulmonaire, c'est la souche PG2. Chez l'agneau, les mycoplasmes retrouvés sont *Mycoplasma arginini*. (Cf. figure 8B).

Figure 8 - Résultats Couples Brebis A / Agneau a



A Résultats bactériologiques des prélèvements post-mortem du couple Brebis A / Agneau a



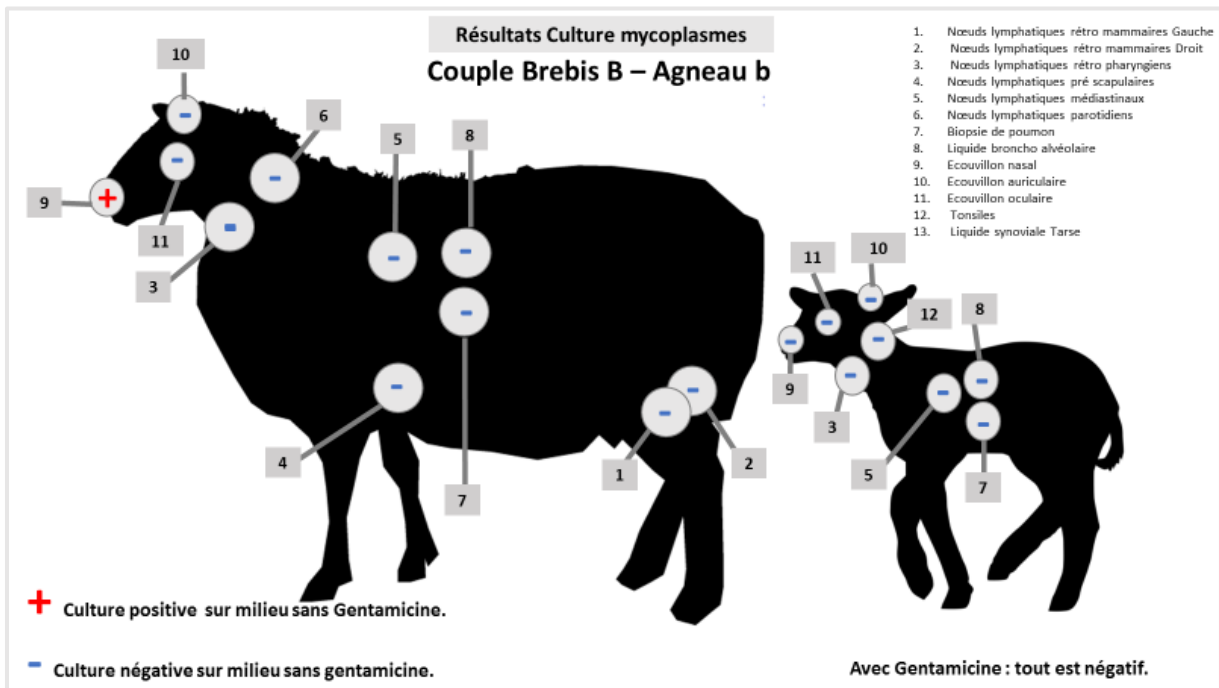
B - Résultats PCR multiplex des prélèvements post-mortem du couple Brebis A / Agneau a

2.2.2 Couple Brebis B / Agneau b

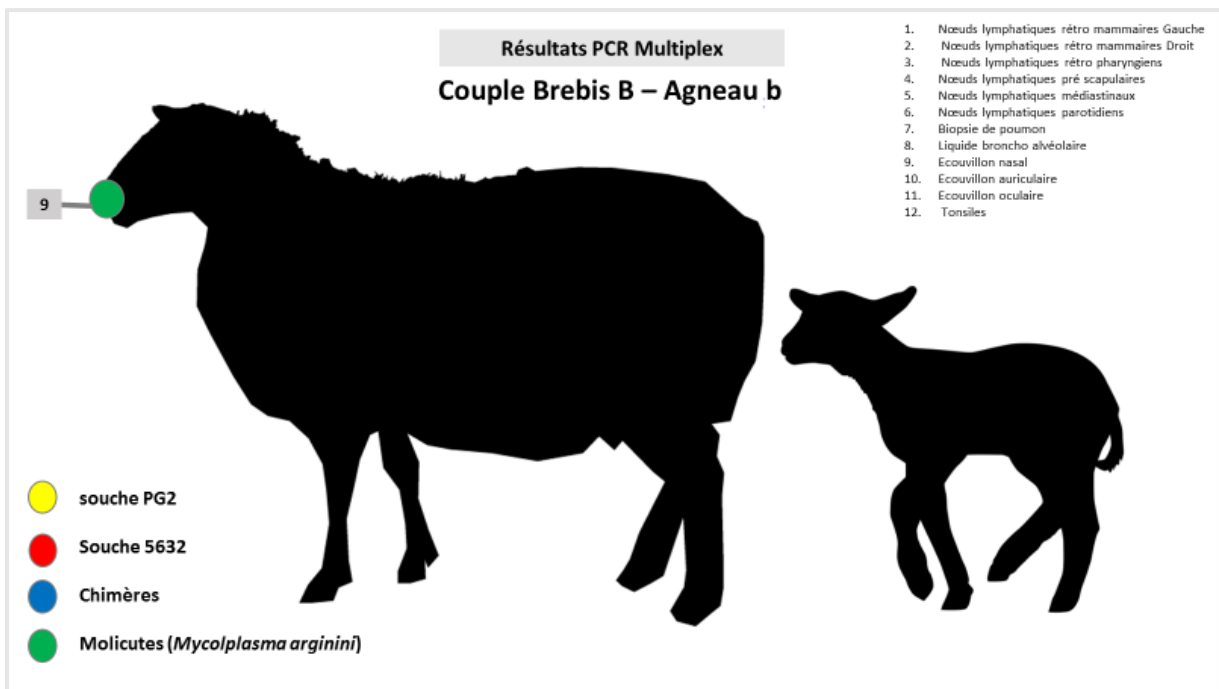
Chez la brebis B, après culture, des mycoplasmes sont présents uniquement au niveau de l'orifice nasal. Les analyses sur l'agneau sont toutes négatives (Cf. Figure 9A).

La PCR multiplex a mis en évidence *Mycoplasma arginini* au niveau des cavités nasales de la brebis B (Cf. Figure 9B).

Figure 9 - Résultats Couples Brebis B / Agneau b



A - Résultats bactériologiques des prélèvements post-mortem du couple Brebis B / Agneau b



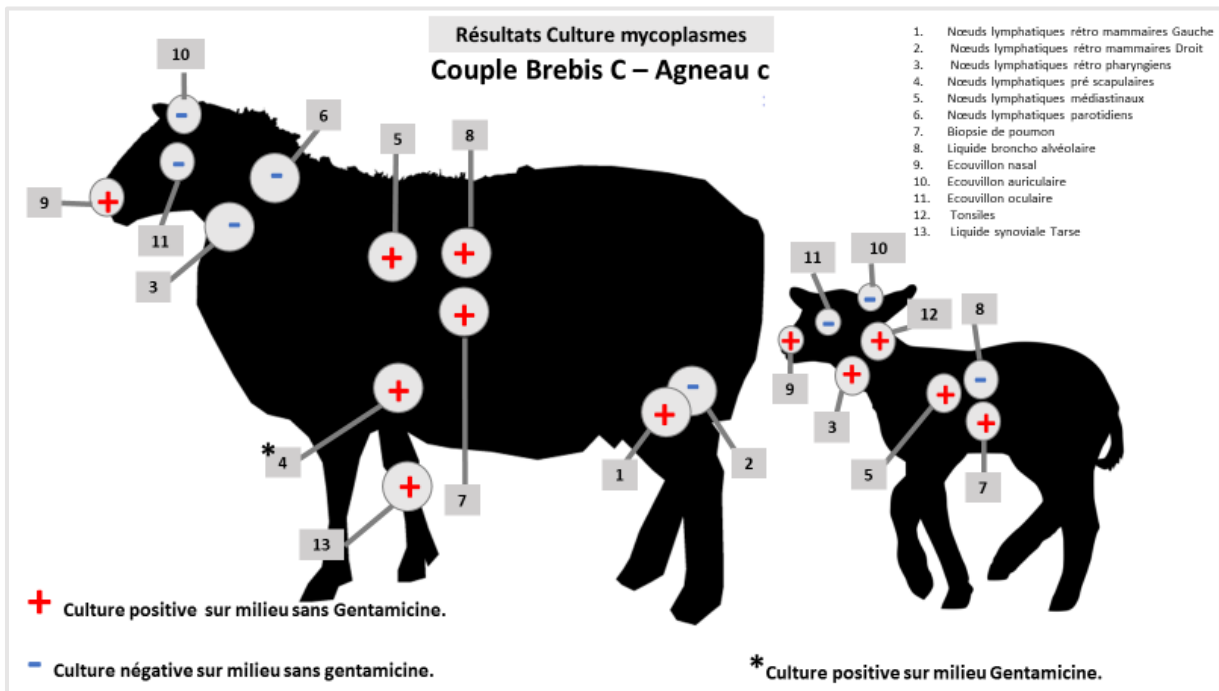
B - Résultats PCR multiplex des prélèvements post-mortem du couple Brebis B / Agneau b

2.2.3 Couple Brebis C / Agneau c

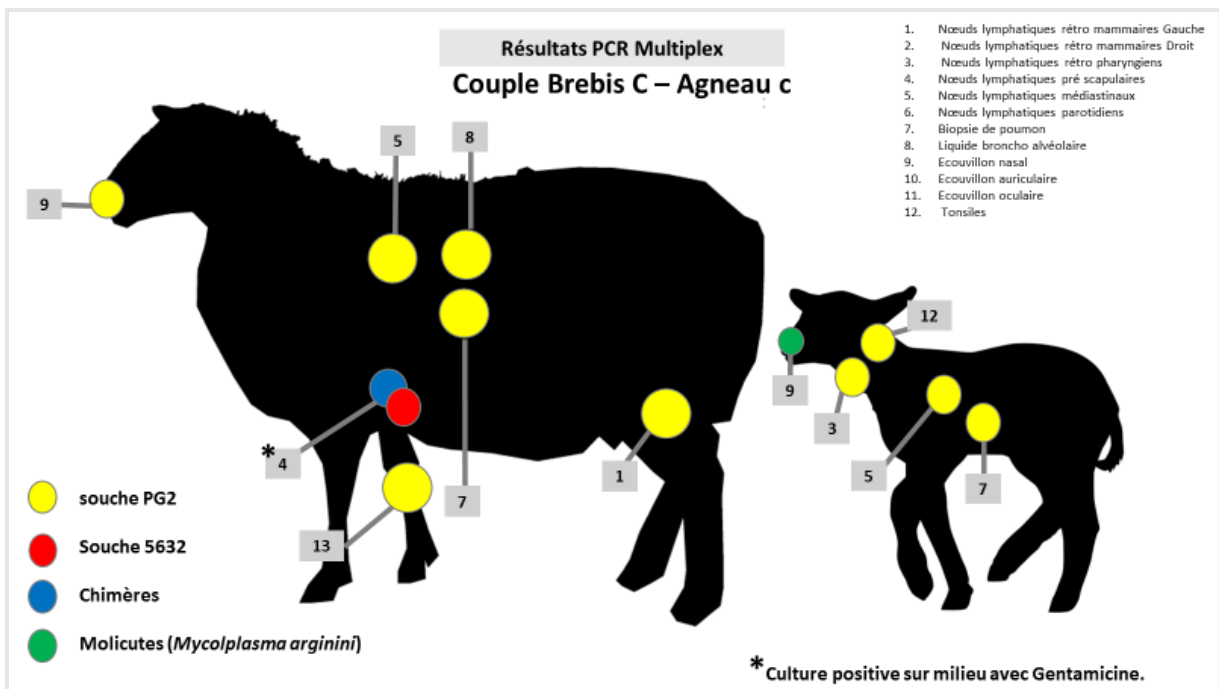
Les analyses microbiologiques chez la brebis C des prélèvements post-mortem montrent une colonisation par des mycoplasmes des nœuds lymphatiques médiastinaux, pré-scapulaires et rétro-mammaire gauche, des poumons et du liquide broncho alvéolaire ainsi que des cavités nasales. De plus, une analyse du liquide synovial de l'articulation du tarse droit montre une culture positive en mycoplasmes. Au niveau des nœuds lymphatiques pré-scapulaires le résultat était positif même en présence de gentamicine. Sur l'agneau c des mycoplasmes ont été retrouvés au niveau des cavités nasales, des tonsilles, des nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens et médiastinaux, des poumons et du liquide broncho alvéolaire (Cf. Figure 10A).

La PCR multiplex permis de montrer que sur la brebis C, c'est la souche PG2 qui domine. Elle est retrouvée sur la majorité des prélèvements positifs en culture (nœuds lymphatiques médiastinaux et rétro-mammaire gauche, poumons, liquide broncho alvéolaire et cavités nasales) excepté au niveau du site d'injection (nœuds lymphatiques pré-scapulaires) où c'est un mélange de souche 5632 et de chimères qui est retrouvé. L'agneau c, est lui aussi colonisé quasiment en totalité par la souche PG2 (tonsilles, nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens et médiastinaux, poumons et liquide broncho alvéolaire) ; seulement au niveau des cavités nasales il a été retrouvé une autre espèce de mycoplasme, *Mycoplasma arginini* (Cf. Figure 10B).

Figure 10 - Résultats Couples Brebis C / Agneau c



A - Résultats bactériologiques des prélèvements post-mortem du couple Brebis C / Agneau c



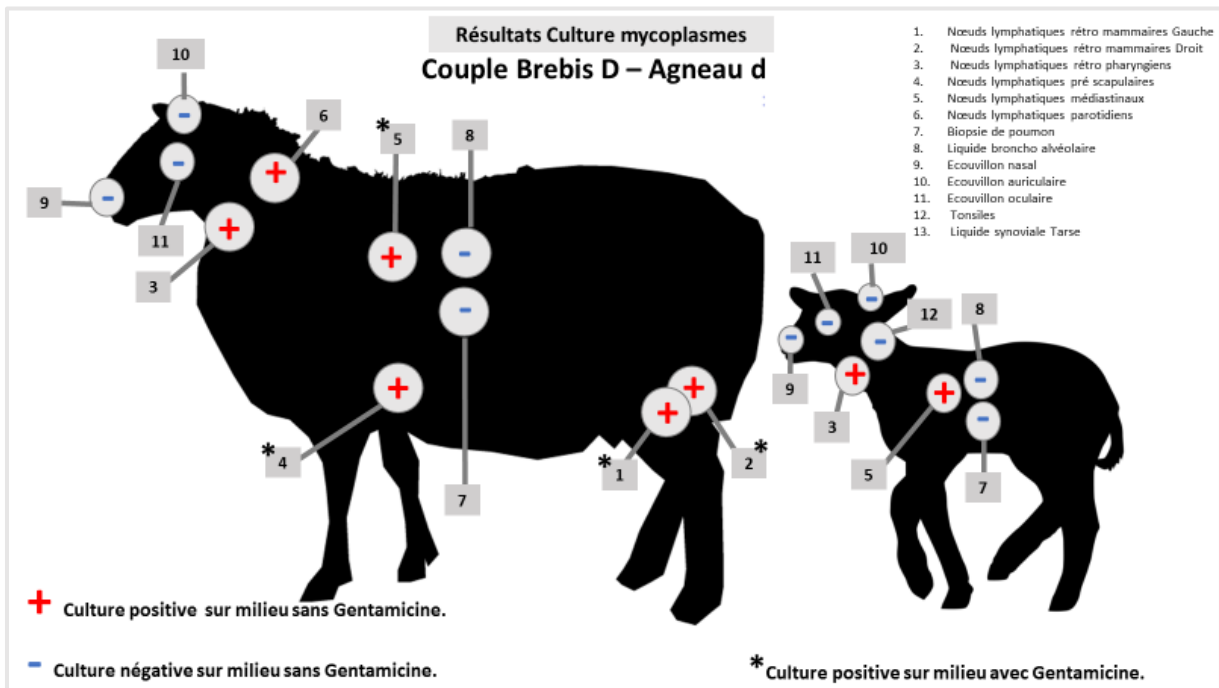
B - Résultats PCR multiplex des prélèvements post-mortem du couple Brebis C / Agneau c

2.2.4 Couple Brebis D / Agneau d

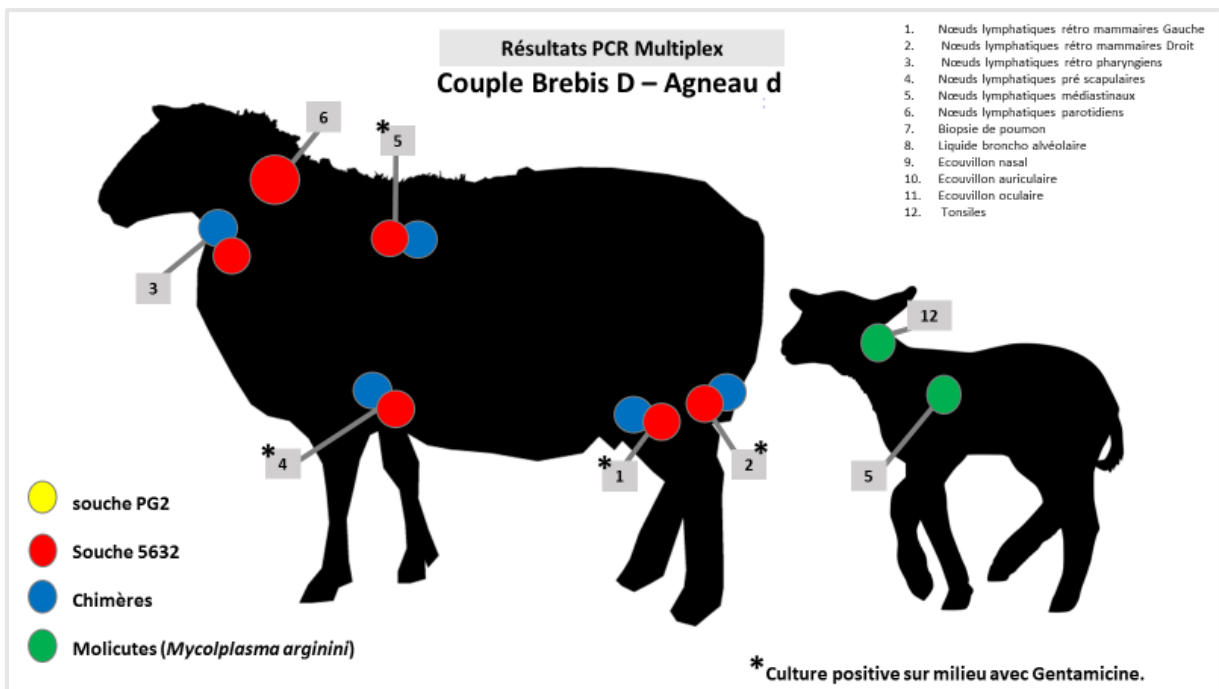
Les analyses microbiologiques des prélèvements post-mortem de la brebis D ont montré la présence de mycoplasmes au niveau des nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens, parotidiens, médiastinaux, pré-scapulaires et rétro-mammaires (droit et gauche). Au niveau des nœuds lymphatiques pré-scapulaires, médiastinaux et rétro-mammaires le résultat était positif même en présence de gentamicine. Sur l'agneau d, les cultures mycoplasmiques des nœuds lymphatiques médiastinaux et rétro-pharyngiens sont positives (Cf. Figure 11A).

La PCR multiplex permet de montrer que la brebis D a été colonisée par un mélange de souches 5632 et chimères sur tous la majorité des organes positifs en culture (nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens, médiastinaux, pré-scapulaires et rétro-mammaires) excepté aux niveaux des nœuds lymphatiques parotidiens où seulement la souche 5632 est présente. Sur l'agneau d, *Mycoplasma arginini* est retrouvé au niveau des nœuds lymphatiques médiastinaux et des tonsilles (Cf. Figure 11B).

Figure 11 - Résultats Couples Brebis D / Agneau d



A - Résultats bactériologiques des prélèvements post-mortem du couple Brebis D / Agneau d



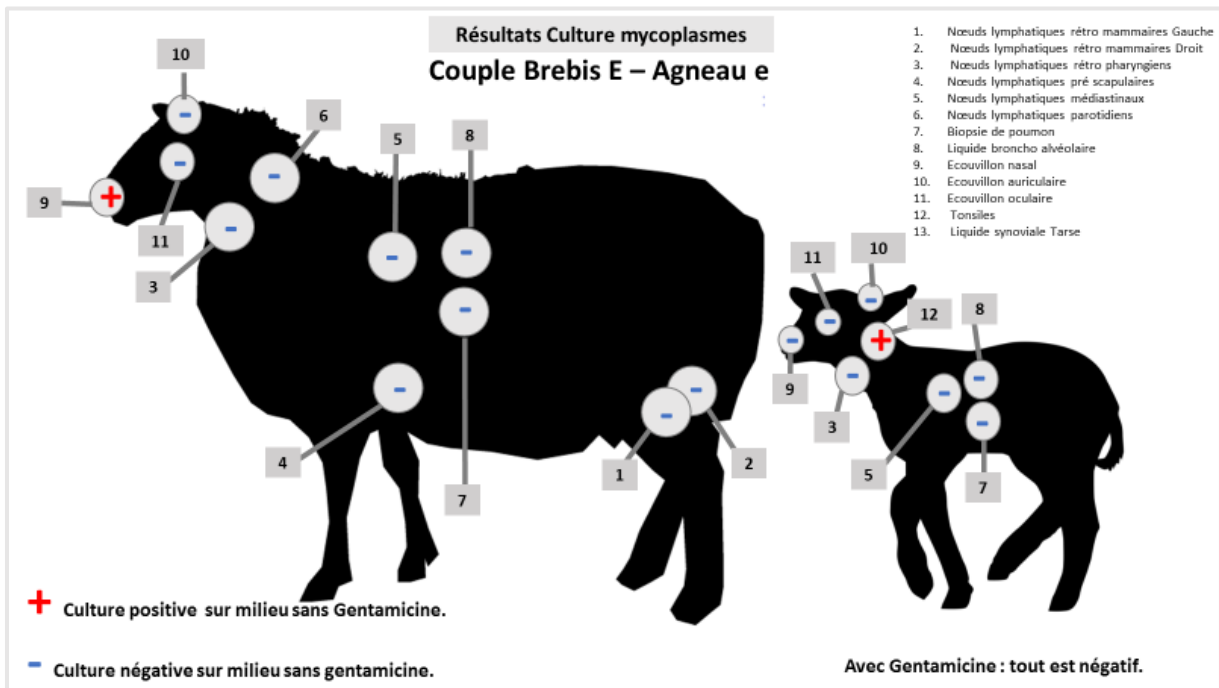
B - Résultats PCR multiplex des prélèvements post-mortem du couple Brebis D / Agneau d

2.2.5 Couple Brebis E / Agneau e

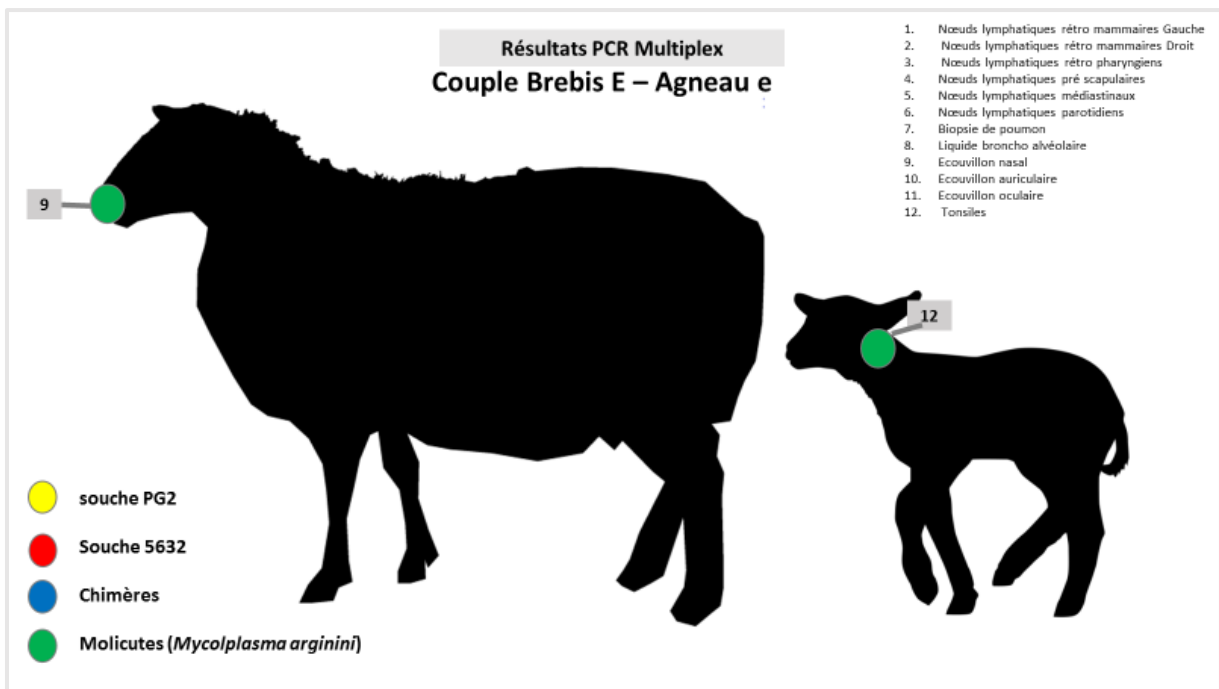
Chez la brebis E seules les cavités nasales ont été colonisées par des mycoplasmes. Enfin chez l'agneau e, des mycoplasmes après culture ont été retrouvées au niveau des tonsilles (Cf. Figure 12A).

La PCR multiplex permet de dire que c'est *Mycoplasma arginini* qui est présent au niveau des cavités nasales de la brebis E et des tonsilles de l'agneau e (Cf. Figure 12B).

Figure 12 - Résultats Couples Brebis E / Agneau e



A - Résultats bactériologiques des prélèvements post-mortem du couple Brebis E / Agneau e



B - Résultats PCR multiplex des prélèvements post-mortem du couple Brebis E / Agneau e

3. Discussion

3.1 Constitution du lot d'animaux

La constitution du lot d'animaux est particulièrement importante pour réaliser une expérimentation animale. Ici, nous avons un groupe constitué de 5 couples de brebis primipares suitées croisées Causse du lot et Ile de France provenant d'un même élevage agréé dans le lot. Le fait d'avoir des animaux provenant du même endroit, du même âge et au même stade physiologique nous a permis de constituer un lot homogène. Cet aspect est important pour pouvoir par la suite interpréter et comparer les résultats.

Pour cette étude, un nombre réduit d'individus a été utilisé. En effet, il était au préalable prévu d'intégrer 6 brebis en lactation à l'étude mais suite à un incident le lot était finalement constitué de 5 brebis suitées. Un nombre réduit était possible grâce à la stratégie d'inoculation des animaux à savoir l'utilisation de chimères et de souches témoins dans un même individu. Ce protocole d'infection expérimentale chez un hôte naturel avait déjà été validé précédemment (Baranowski et al., 2014). Comme le développement clinique de l'agalactie contagieuse chez les ovins peut revêtir différentes formes cliniques dont des formes asymptomatiques sans excrétion de mycoplasmes, un groupe de 5 individus peut toutefois se révéler insuffisant. En effet, sur les 5 brebis, seulement 2 brebis ont excrété des mycoplasmes au cours de l'étude. Augmenter le nombre d'animaux pour être certains d'obtenir suffisamment d'animaux excréteurs pourrait être intéressant mais en pratique cela ne se justifie pas pour des raisons essentiellement éthiques.

Les critères d'inclusion des animaux sont principalement accés sur l'aspect sanitaire. Le fait d'avoir sélectionné des brebis primipares augmente les chances d'avoir des brebis saines au niveau de la mamelle. De plus, les brebis primipares ont plus de chance que les multipares de développer des signes cliniques liés à l'agalactie contagieuse (Bergonier, 1996 ; Bergonier et Berthelot, 2008). Enfin, avec un lot d'agnelles, le risque d'avoir des infections mammaires antérieures est limité.

En revanche, les brebis primipares peuvent être un peu moins maternelles que celles ayant déjà eu une ou plusieurs portées. Ce critère peut être important pour la gestion des animaux pendant l'expérimentation. Les agneaux peuvent être délaissés ou ne pas avoir accès suffisamment à la mamelle. Cet aspect « maternel » est peut-être à l'origine de la perte d'un agneau au début de l'expérimentation : l'agneau retrouvé blessé s'est probablement fait écraser par sa mère et le couple mère/agneau a dû être retiré du lot.

3.2 Durée de l'expérimentation

Mycoplasma agalactiae peut être excrété dans le lait à partir du 7^{ème} jour post inoculation et jusqu'à 60 jours après celle-ci (Bergonier *et al.*, 1997). En effet, *Mycoplasma agalactiae* peut rester en latence au point d'inoculation et coloniser tardivement les organes cibles à savoir la mamelle et les articulations (Sanchis *et al.*, 1998).

L'expérimentation a duré au total 6 semaines (1 semaine d'adaptation et 5 semaines post inoculation). Une prolongation des prélèvements au delà de 5 semaines post-inoculation aurait peut être permis d'obtenir une excrétion plus tardive. Nous pouvons penser à la brebis D qui présentait une colonisation quasiment générale par des souches 5632 et des chimères et aucune excrétion de mycoplasmes dans le lait ; si le temps de prélèvement avait été plus long, peut-être aurait-elle fini par excréter ?

Cependant, d'autres études plus récentes ont montré une excrétion de toutes les brebis dans les 30 jours (Baranowski *et al.*, 2014) ou d'1/3 des brebis dans les 7 jours (Amblard, 2016). Il a alors été décidé de réaliser l'expérimentation pendant 5 semaines post-inoculation.

3.3 Préparation des inocula et inoculation

3.3.1 Choix des souches

Dans une étude précédente (Amblard, 2016) il a été montré que seule la souche PG2 colonisait la mamelle. La souche 5632 quant à elle restait localisée au point d'inoculation. Pour tester l'hypothèse que des gènes de PG2 seraient responsables du tropisme mammaire, des chimères à partir des génomes des souches PG2 et 5632 ont été construites (Dordet-Frisoni *et al.*, 2014) et d'inoculées aux brebis associées aux souches sauvages témoins dans le but de reproduire une infection expérimentale.

3.3.2 Mode d'inoculation

L'inoculation s'est faite par voie sous cutanée en avant de l'épaule gauche. Les modèles des études précédentes de reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse avaient été réalisés de la même façon et avaient réussi à mimer l'infection naturelle (Baranowski *et al.*, 2014 ; Amblard, 2016) : des signes cliniques d'agalactie contagieuse étaient visibles et une excrétion dans le lait avait lieu.

D'autres modes d'inoculation ont été utilisés lors de reproductions expérimentales de l'agalactie contagieuse comme la voie intra-mammaire et la voie sous conjonctivale. La voie intra-mammaire ne convenait pas à notre étude car nous voulions comprendre la colonisation tissulaire et particulièrement mammaire de différentes souches de *Mycoplasma agalactiae* ; il était donc nécessaire d'inoculer les animaux sur un site différent. La voie sous conjonctivale, est une voie plus difficile à mettre en œuvre avec de plus un risque de contamination entre animaux. (Sanchis *et al.*, 1998). Sur ces critères et sa facilité de mise en œuvre la voie sous cutanée a donc été retenue.

3.3.3 Titre de l'inoculum

Les études précédentes de reproduction de l'agalactie contagieuse utilisaient des titres d'inoculum supérieurs ou égaux à 10^7 UFC / mL. (Macowan et al., 1984 ; Sanchis et al., 2000). Plus récemment il a été montré que des titres plus faibles de 10^3 UFC / mL avec une inoculation par voie sous cutanée d'un volume d'un millilitre par brebis provoquaient des excrétions de mycoplasmes dans le lait et des signes cliniques atténués mais visibles. (Baranowski et al., 2014).

Nous voulions dans un même temps inoculer les 2 souches témoins et les chimères. La concentration totale de l'inoculum était de 10^7 UFC / mL avec une concentration de 10^5 UFC / mL pour chaque souche (PG2 – 5632 – Chimères). Un volume de deux millilitres a été injecté à chaque brebis.

Au vu des résultats des études précédentes, en optant pour ces concentrations et ce volume on était assuré de pouvoir provoquer des excrétions de mycoplasmes dans le lait et des signes cliniques. Cependant, à la fin de l'expérimentation seulement 2 brebis sur 5 ont excrété des mycoplasmes dans le lait et les signes cliniques de l'agalactie contagieuse étaient légers. Ces résultats sont accords avec l'étude précédente (Amblard, 2016) où environ 1/3 des brebis excrétaient. Il est possible qu'un titre d'inoculation plus élevé provoquerait des excrétions sur un plus grand nombre d'animaux mais avec le risque de provoquer une agalactie totale.

3.4 Analyses microbiologiques et PCR

Pour cette étude, la culture bactérienne a été l'étape préliminaire pour la recherche de mycoplasmes. Dans le cas de culture mycoplasémique positive, une PCR multiplex a été réalisée pour déterminer l'espèce et la souche de mycoplasme. De ce fait, toute la sensibilité de la manipulation dépend de la sensibilité de la culture. Nous pouvons nous poser la question de la sensibilité de cette méthode basée sur la culture. Il serait intéressant de réaliser des PCR directement sur tous les prélèvements même dans le cas de résultats négatifs en culture.

3.5 Conditions d'hébergement des animaux

L'utilisation d'OGM oblige d'utiliser un bâtiment de sécurité de niveau supérieur ou égal à 2. Le logement utilisé était de niveau 3. Les infrastructures utilisées sont prévues pour loger des veaux ; des adaptations étaient alors nécessaires. Du grillage a été disposé tout autour de la cage pour combler un espace qui laissait la possibilité aux agneaux de s'échapper. Mais suite à des blessures sans gravité sur quelques animaux à cause de ce grillage, il a été décidé de le retirer. A plusieurs reprises un agneau a été retrouvé à l'extérieur. Ce problème a cessé quand les agneaux sont devenus assez gros.

De plus, le bâtiment d'unité 3 implique des règles d'hygiène strictes. Pour cette raison, les animaux ont évolué sur caillebotis. Les animaux n'étaient pas habitués à ce type de revêtement ; une période d'adaptation était nécessaire. Les brebis ont eu une semaine d'adaptation à leur nouvel environnement avant l'inoculation. Cette courte période ne nous assurait pas une adaptation complète. Il est possible que des problèmes locomoteurs diagnostiqués pendant l'expérimentation soient dus en parti aux caillebotis. Un environnement semblable à leurs habitudes ou une période d'adaptation plus longue nous auraient assuré de s'affranchir de cet inconvénient.

3.6 Suivi clinique et résultats

Tous les jours l'état général des animaux était évalué. L'appétit était apprécié tant pour les brebis que pour les agneaux et les signes cliniques spécifiques de l'agalactie contagieuse (boiterie – kerato conjonctivite – mammites) étaient objectivés. Les signes de mammites étaient recherchés particulièrement les jours de prélèvements avec la réalisation d'un examen clinique rapproché de la mamelle. La consistance et la chaleur de la mamelle, l'état des trayons, la taille des nœuds lymphatiques rétro-mammaires, la présence de douleur et l'aspect du lait étaient les critères principaux pour objectiver l'état clinique de la mamelle. Sur les 6 semaines d'expérimentation, quatre opérateurs ont objectivé tour à tour ces critères ; un biais d'appréciation en fonction de la variabilité de chacun était possible.

Cliniquement les signes étaient faibles et peu évocateurs. Nous avons pu observer des atteintes articulaires sur toutes les brebis à partir de la 3^{ème} semaine post

inoculation pour les brebis A, C et E, de la 4^{ème} semaine pour la brebis D et de la 5^{ème} semaine pour la brebis B. Or chez la brebis E, *Mycoplasma agalactiae* n'a pas été détecté ni dans le lait ni dans les prélèvements postmortem. Sur la brebis B, *Mycoplasme agalactiae* n'a pas été retrouvé en postmortem. Il est alors difficile de penser que les atteintes articulaires sur ces 2 brebis ont été causées par *Mycoplasma agalactiae*. Nous pouvons supposer que les arthrites suspectées pendant l'expérimentation étaient plutôt dues aux caillebotis du lieu d'hébergement.

En ce qui concerne l'atteinte mammaire, il a été observé une augmentation des nœuds lymphatiques rétro-mammaires des brebis B et C à partir de la 4^{ème} semaine post-inoculation. Ceux sont ces mêmes brebis qui ont excrété des mycoplames dans le lait. De ce fait, nous pouvons penser que l'augmentation des nœuds lymphatiques sont une réponse clinique à une colonisation par *Mycoplasma agalactiae*. Cela a pu être confirmé par l'analyse des nœuds lymphatiques rétro mammaires chez la brebis C : culture et PCR positives. En revanche, chez la brebis B, les résultats sont négatifs et donc en contradiction avec la clinique.

3.7 Prélèvements de lait et résultats

Les prélèvements de lait étaient réalisés 3 fois par semaine (lundi – mercredi – vendredi). L'excrétion d'agents pathogènes dans le lait dépend de la variabilité individuelle. Dans une étude précédente, en inoculant la souche PG2 par voie sous cutanée, il a été montré que toutes les brebis excrétaient des mycoplasmes dans le lait (Baranowski *et al.*, 2014). En revanche, dans une étude plus récente qui réalisait une co-infection (souche PG2 et souche 5632) inoculée par voie sous cutanée, seulement 1/3 des animaux excrétaient des mycoplasmes dans le lait. (Amblard, 2016). Dans notre étude, 2 brebis sur 5 ont excrété *Mycoplasma agalactiae* dans le lait. Les résultats sont comparables à ceux de la précédente étude. Trois groupes de brebis se distinguent. Un groupe constitué de la brebis C qui a eu une excrétion précoce et durable de *Mycoplasma agalactiae* ; un groupe constitué de la brebis B qui a eu une excrétion plus tardive et transitoire et enfin un 3^{ème} groupe constitué des brebis A, D et E qui n'ont jamais excrété de mycoplasme au cours de l'expérimentation.

Les prélèvements de lait ont été réalisés sur des tubes stériles, en nettoyant le pis à l'alcool et en changeant de gants entre chaque brebis. Ces conditions ont normalement permis de s'affranchir des contaminations croisées entre les brebis. Cependant, la brebis B a eu une excrétion bilatérale unique le 18 novembre 2016 et aucun mycoplasme n'a été retrouvé sur les prélèvements post-mortem. Il est légitime de se demander si la brebis B a réellement eu une infection transitoire par *Mycoplasma agalactiae* ou si le résultat du 18 novembre est un faux positif. Une analyse sérologique permettra de répondre à la question (résultats en attente).

Les PCR multiplex réalisées sur les échantillons, ont permis de mettre en évidence la souche PG2 dans le lait de ces 2 brebis (Brebis B et C). Ces résultats sont identiques à ceux de l'étude précédente réalisée dans les mêmes conditions de co-infection (Amblard, 2016). La souche 5632 n'est quant à elle jamais retrouvée dans le lait.

3.8 Prélèvements post-mortem et résultats

Suite aux autopsies, nous avons effectué des prélèvements qui avaient un intérêt pour la recherche de mycoplasmes : nœuds lymphatiques (prés-scapulaires – médiastinaux – rétro pharyngiens – parotidiens – rétro mammaires) ; poumon ; liquide de lavage broncho-alvéolaire ; liquide synovial ; écouvillons oculaires, auriculaire et nasal. Tous les prélèvements étaient réalisés sur tous les animaux excepté le prélèvement de liquide synovial qui était effectué uniquement lors d'arthrite clinique le jour de l'autopsie.

Seule, la brebis C a fait l'objet du prélèvement de liquide synovial. Les autres brebis ne présentaient pas de modification articulaire le jour de l'autopsie. Or, nous avons vu des articulations enflammées pendant l'expérimentation. Il serait intéressant lors de futures études de ponctionner les articulations modifiées pendant l'expérimentation pour savoir si les mycoplasmes sont en cause.

Sur les prélèvements de deux brebis (B et E) aucun mycoplasme pathogène n'a été retrouvé. Ces brebis ont, à priori, réussi à se débarrasser de *Mycoplasma agalactiae* suite à l'inoculation. Ce résultat est surprenant sur la brebis B puisque nous avons mis en évidence une excrétion lactée ponctuelle ; nous nous attendions donc à

retrouver des mycoplasmes au niveau des nœuds lymphatiques rétro – mammaires. Dans ce cas, nous pouvons imaginer que l'infection de l'animal a été transitoire ou alors que l'analyse du lait de la brebis B le 18 novembre 2016 est un résultat faussement positif. En revanche, sur ces deux brebis (B et E) comme sur les agneaux a, c, d et e, nous avons mis en évidence la présence d'un mycoplasme commensal non pathogène : *Mycoplasma argini*.

Les trois autres brebis (B, C et D) ont été colonisées par *Mycoplasma agalactiae* et présentent une répartition des souches différente :

- Chez la brebis A, la souche 5632 était présente au niveau du point d'injection, (nœuds lymphatiques pré-scapulaires) et la souche PG2 était quant à elle présente au niveau pulmonaire et au niveau des nœuds lymphatiques médiastinaux.
- Chez la brebis C, nous avons observé une colonisation massive par la souche PG2 (nœuds lymphatiques médiastinaux et rétro-mammaire gauche, poumons, liquide broncho alvéolaire et cavités nasales) et une persistance de la souche 5632 au niveau du point d'injection (nœuds lymphatiques prés-scapulaires).
- Chez la brebis D, aucune souche PG2 n'a été détectée mais une colonisation massive par la souche 5632 et des chimères a été notée (nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens, parotidiens, médiastinaux, pré-scapulaires et rétro-mammaires).

Le seul agneau où nous avons mis en évidence *Mycoplasma agalactiae* est l'agneau c au niveau de plusieurs prélèvements (tonsilles, nœuds lymphatiques médiastinaux, nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens et poumons). C'est la souche PG2 qui est retrouvée ; la même qui est en majorité présente chez la brebis C et notamment au niveau des nœuds lymphatiques mammaires et dans le lait. Ceci est cohérent avec une contamination verticale de la brebis vers l'agneau via le lait.

Aucune co-colonisation d'organe par les souches PG2 et 5632 n'a été observée. Sachant qu'*in vitro*, la souche 5632 a une vitesse de croissance plus rapide que celle de la souche PG2, nous pouvons supposer qu'*in vivo* et lors de l'étape de culture *in vitro* ces deux souches sont en compétition. Ainsi, nous observons tantôt une dominance par la souche PG2 (brebis C) et tantôt une dominance par la souche 5632 (brebis D).

D'après ces résultats, seule la souche PG2 colonise l'appareil respiratoire. Au niveau du point d'injection, dans les nœuds lymphatiques pré-scapulaires, nous retrouvons uniquement la souche 5632 et les chimères. Ces résultats sont comparables à ceux observés lors de l'étude précédente (Amblard, 2016).

En revanche, contrairement à cette étude (Amblard, 2016), notre étude met en évidence la capacité des deux souches PG2 et 5632 et des chimères à coloniser les nœuds lymphatiques rétro-mammaires. En effet, dans l'étude précédente, seule la souche PG2 avait été mise en évidence à ce niveau. Le fait de retrouver des souches 5632 au niveau des nœuds lymphatiques mammaires est surprenant par rapport à l'hypothèse avancée qui suggérait qu'une ou des parties de gènes de la souche PG2 absents ou inactivés chez la souche 5632 serait responsable(s) du tropisme mammaire. L'hypothèse initiale est ainsi remise en cause et fait émerger d'autres hypothèses. Une 1^{ère} hypothèse serait que la souche 5632 serait capable de coloniser la mamelle au même titre que la souche PG2 mais ne serait pas capable de se développer dans le lait car inhibée par ce milieu. Une autre hypothèse serait qu'il n'y ait pas de réelle différence de tropisme entre les 2 souches mais une différence de vitesse de colonisation, inversement à ce qui est observé *in vitro* : *in vivo* la souche 5632 diffuserait dans tout l'organisme plus lentement que la souche PG2. Des tests de croissance comparatifs des 2 souches dans le lait et du milieu de culture à différentes concentrations en lait permettrait de tester la 1^{ère} hypothèse. Quant à la 2^{ème} hypothèse, il serait intéressant de réaliser une étude plus longue pour voir si à long terme la souche 5632 pourrait être excrétée dans le lait.

Conclusion

Suite à l'observation d'une différence de tropisme entre 2 souches de *Mycoplasma agalactiae*, PG2 et 5632, l'étude avait pour objectif de déterminer les gènes liés au tropisme tissulaire au travers d'une infection expérimentale avec une collection de mutants chimériques intégrant des parties de PG2 dans 5632. Basé sur l'hypothèse que le génome de la souche PG2 contenait un ou plusieurs gène(s) responsable(s) du tropisme mammaire, absent(s) ou inactivé(s) chez la souche 5632, des chimères contenant la ou les partie(s) de génomes responsable(s) de ce tropisme auraient dû être isolées dans le lait. Or, aucune chimère n'a été détectée dans le lait. Sur les cinq brebis inoculées, deux ont excrété *Mycoplasma agalactiae* dans le lait mais dans les deux cas seule la souche PG2 a été identifiée.

Aucune co-colonisation des souches PG2 et 5632 n'a pu être mise en évidence sur les prélèvements analysés. L'existence d'une compétition entre ces deux souches pourrait expliquer la dominance et l'isolement systématique d'une seule souche, soit la PG2 soit la 5632, lors des prélèvements chez l'animal.

La souche 5632 et les chimères ont été détectées au niveau du point d'injection (nœuds lymphatiques pré-scapulaires) mais aussi au niveau de différents organes comme les nœuds lymphatiques rétro-mammaires. La souche 5632 est donc capable de coloniser l'ensemble de l'organisme dont la mamelle. Ce résultat remet en question l'hypothèse initiale de gènes responsables du tropisme mammaire uniquement présents ou exprimés chez la souche PG2. Toutefois, la souche 5632 n'a jamais été isolée dans les prélèvements de lait.

Ces résultats nous engagent à émettre d'autres hypothèses explicatives. Une 1^{ère} hypothèse serait que la souche 5632 serait incapable de diffuser dans le lait car inhibée par ce dernier. Elle diffuserait ainsi au niveau des nœuds lymphatiques rétro-mammaires mais jamais dans le lait. Une 2^{ème} hypothèse serait qu'il n'y ait pas de différence de tropisme tissulaire au sens strict entre les 2 souches (PG2 et 5632) mais une différence de vitesse de colonisation : inversement à ce qui est observé pour la vitesse de croissance *in vitro*, la souche 5632 serait capable de coloniser la mamelle mais plus lentement que la souche PG2.

Pour tester la 1^{ère} hypothèse, des tests de croissance comparatifs entre les 2 souches dans le lait ou en milieu de culture contenant différentes concentrations de lait permettraient de voir si la souche 5632 a les mêmes capacités à se développer en présence de lait que la souche PG2. Quant à la 2^{ème} hypothèse, une étude plus longue permettrait de voir si à plus long terme la souche 5632 peut être excrétée dans le lait.

Les résultats de cette étude remettent en cause l'hypothèse initiale sur les facteurs chromosomiques impliqués dans la dissémination et la colonisation chez *Mycoplasma agalactiae*. Aux vues des résultats, l'utilisation des chimères apporte peu d'intérêt pour comprendre le tropisme de *Mycoplasma agalactiae* car aucune chimère n'a pu être exclusivement isolée dans un organe. En revanche, une étude utilisant un modèle expérimental basé sur une simple inoculation de la souche 5632 permettrait peut-être de faire avancer les connaissances de dissémination pour s'affranchir des phénomènes de compétitions.

Cette étude conforte l'idée qu'au sein de l'espèce *Mycoplasma agalactiae*, des différences de mécanisme existent entre différentes souches. Ces différences peuvent expliquer en partie la difficulté de réussite des moyens de lutte contre l'agalactie contagieuse ; en particulier la difficulté d'élaborer un vaccin efficace. Les connaissances des mécanismes d'action des différentes souches sont primordiales pour espérer réduire l'impact de l'agalactie contagieuse dans les élevages de petits ruminants.

Bibliographie

AMBLARD Océane (2016). Etude de la diffusion in vivo de *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis : essai préliminaire. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 203 p.

BARANOWSKI E., BERGONIER D., HYGONENQ M-C., RONSIN P., BERTHELOT X., *et al.* (2014). Experimental infections with *Mycoplasma agalactiae* identify key factors involved in host-colonization.

BECKER C., RAMOS F., SELLAL E., MOINE S., POUMARAT F., et TARDY F. (2012). « Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants ». *Journal of Microbiological Methods* 90.

BERGONIER D. (1996). Etude de la variabilité intra-spécifique de *Mycoplasma agalactiae* : bases pour l'amélioration du diagnostic de l'agalactie contagieuse. Thèse d'Université. Université Claude Bernard, Lyon, 205 p.

BERGONIER D., et BERTHELOT X. (2008). « Mycoplasmoses des petits ruminants : le syndrome d'agalactie contagieuse. » *Bull. Acad. Vet. France*, 161, 167, 177.

BERGONIER D., BERTHELOT X., POUMARAT F., (1997) .Contagious Agalactia of small ruminants : current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci Tech Off Int Epiz.* 16 : 848 – 873.

BERGONIER D., POUMARAT F. (1996). Agalactie contagieuse des petits ruminants : épidémiologie, diagnostic et contrôle. *Revue scientifique et technique de l'office international des épizooties*, 15(4), pp. 1431-1475.

BERGONIER D. et THIAUCOURT F. (2003). L'agalactie contagieuse des petits ruminants. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et

régions chaudes (ed. P.C. Lefèvre, J. Blancou et R. Chermette), pp. 809 – 825. Éditions Tec et Doc, Lavoisier.

CORRALES J. *et al.* (2007). Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*, Volume 68, pp. 154-166.

DAMASSA A., WAKENELL P., BROOKS D.L. (1992). Mycoplasmas of goats and sheep. *J Vet Diagn Invest.* 4 : 101 – 113.

DORDET-FRISONI E., SAGNE E., BARANOWSKI E., BRETON M., NOUVEL LX., BLANCHARD A., MAREDA MS., TARDY F., SIRAND-PUGNET P., CITTI C. (2014). Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. *MBio.* 2014 Nov 25;5(6):e01958. doi: 10.1128/mBio.01958-14.

GDS du 64 (le Groupement de Défense Sanitaire du Béarn et du Pays-Basque) <http://www.gds64.fr/maladies-actions-sanitaires/ovins-caprins/agalactie-contagieuse/caracteristiques-de-lagalactie-contagieuse/> (page consultée le 12.01.17)

LEON-VIZCAINO L., GARRIDO-ABELLAN F., CUBERO-PABLO M.J., et PERALES A . (1995). “Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine,” *Veterinary Record*, vol. 137, no. 11, pp. 266–269.

MACOWAN K .J, BRAND T. F., MCGILLVERAY N., et HUNTER A. R. (1984). “Experimental infection of castrated lambs with *M. agalactiae*,” *The Journal of Hygiene*, vol. 93, no. 3, pp. 455–463.

NOUVEL LX., SIRAND-PUGNET P., MAREDA MS., SAGNE E., BARBE V., MANGENOT S., SCHENOWITZ C., JACOB D., BARRE A., CLAVEROL S., BLANCHARD A., CITTI C.(2010). Comparative genomic and proteomic analyses of

two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. BMC Genomics. 2010 Feb 2;11:86. doi: 10.1186/1471-2164-11-86.

PEPIN M., DUFOUR P., LAMBERT M, AUBERT M., VAGNOLES A., ROTIS T.
VAN DE WIELE A., BERGONIER D. (2003). Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. J Vet Diagn Invest, 15, 281-285.

SANCHIS R., ABADIE G., LAMBERT M. *et al.* (1998).
Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs. Small Ruminant Res., 27, 31-39.

SARRIS K., ZDRAKAS, PAPASTERIADIS A., and PAPADOPOULOS O. (1989).
“Experimental contagious agalactia vaccine,” Bulletin Hellenic Veterinary Medicine Society, vol. 40, pp. 71–74.

Sirand-Pugnet P., Lartigue C., Marendra M., Jacob D., Barré A., Barbe V., Schenowitz C., Mangenot S., Couloux A., Segurens B., de Daruvar A., Blanchard A., Citti C. (2007).
BEING PATHOGENIC, PLASTIC, AND SEXUAL WHILE LIVING WITH A NEARLY MINIMAL BACTERIAL GENOME. PLoS Genet. 2007 May 18;3(5):e75.

SKAPSKI A, HYGONENQ M-C, SAGNE E, GUIRAL S, CITTI C, BARANOWSKI E. (2001). Genome-scale analysis of *Mycoplasma agalactiae* loci involved in interaction with host cells.

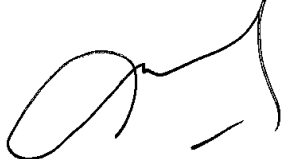
ZAVAGLI V.(1951). L'agalactie contagieuse des brebis et des chèvres. Bull. Off. int. Epizoot., 36, 336-362.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, NOUVEL Xavier, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **JOUANOLOU Lucie** intitulée « **Mycoplasmoses à *M. agalactiae* chez la brebis en lactation : Etude du tropisme tissulaire de 2 souches de *M. agalactiae*** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 30 juin 2017
Docteur NOUVEL Xavier
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET

Professeur Jacques IZOPET
Chef de Service de Virologie
Plateau Technologique d'Infectiologie
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
TSA 40081 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
Mél. **9562ANOL@toulouse.fr** - Tél. 05 67 69 04 25

a été admis(e) sur concours en : 2012
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 23/06/2016
a validé son année d'approfondissement le : 24/05/2017
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU


Régine ANDRIEU-OBRECHT

NOM : JOUANOLOU

PRENOM : LUCIE

TITRE : Mycoplasmose à *M. agalactiae* chez la brebis en lactation : Etude du tropisme tissulaire de 2 souches de *M. agalactiae*

RESUME :

Lors d'une reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis, une différence de tropisme avait été constatée entre 2 souches sauvages (PG2 et 5632). Notre étude avait pour objectif de déterminer les bases génétiques potentiellement responsables de cette différence à l'aide de souches chimériques, fabriquées à partir des 2 souches sauvages, et inoculées aux animaux en association avec les souches sauvages. Un suivi clinique et bactériologique a été réalisé. Les résultats de cette étude laissent entrevoir un niveau de complexité supérieur sur l'hypothèse initiale de facteurs chromosomiques impliqués dans la dissémination et la colonisation chez *Mycoplasma agalactiae*. Ils montrent que la différence de tropisme au sens strict entre souches pourrait être liée à des différences de mécanismes d'action propres à chaque souche. Toutes les souches seraient capables de coloniser l'ensemble de l'organisme mais selon différentes modalités et conditions.

MOTS CLES : MYCOPLASME – MAMELLE – OVIN – AGALACTIE – MAMMITE – CHIMERE

ENGLISH TITLE : *M. agalactiae* mycoplasmosis in lactating ewes: Study of tissue tropism of 2 strains of *M. agalactiae*

ABSTRACT :

During an experimental infection in ewe of the contagious agalactia with *Mycoplasma agalactiae*, 2 strains (PG2 and 5632) have shown a difference of tropism. The objective of our study was to determine the genetic basis of this difference by using chimeric strains, combination of PG2 and 5632 genomes, inoculated all with the two wild-type strains. Animals were clinically and bacteriologically monitored during 6 weeks.

Results suggest to consider the initial hypothesis of genetic chromosomal factors implication in dissemination and colonization in *Mycoplasma agalactiae* as more complex. They show that a strict difference in tropism between strains is not so clear and have to be linked with differences of mechanisms specific to each strain. All strains would be able to colonise all part of the organism but under different ways and conditions.

KEY WORDS : MYCOPLASMA – UDDER – SHEEP – AGALACTIA – MASTITIS - CHIMERA