



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4583](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4583)

To cite this version :

BRESSOLIN, Aude. *Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse à Mycoplasma agalactiae chez la brebis en lactation.* Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2011, 64 p.

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

Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis en lactation

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2011
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BRESSOLIN Aude, Dorothée
Née, le 16 avril 1984 à CHOLET (49)

Directeur de thèse : M. le Docteur Dominique BERGONIER

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Dominique BERGONIER
M. Xavier BERTHELOT

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

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
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. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYEMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
- Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur DABERNAT,

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie-Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur BERGONIER,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la Reproduction

En remerciement pour son enseignement, son soutien et ses conseils dans ce travail.

Monsieur le Professeur BERTHELOT,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la Reproduction

En remerciement pour son enseignement et pour avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Je souhaite dédier, avant tout, cette thèse à ma meilleure amie Déborah Rambaud, avec qui j'aurais tant aimée partager ce merveilleux moment de ma vie et malheureusement pour moi si tu n'es plus là, aujourd'hui tu as toujours été la force qui m'a portée pendant toutes ces années d'études. Je ne t'oublierai jamais et tu resteras à jamais au fond de mon cœur.

A mes parents, pour leur soutien tout au long de ces années d'études. Pour avoir toujours accepté de respecter mes choix, m'avoir toujours suivi et soutenu dans toutes mes entreprises. Je vous aime très très fort même si aujourd'hui vous avez décidé de vous séparer.

A ma sousoure, je t'aime plus que tout au monde. Je suis plus admirative envers toi que tu ne puisses le penser. J'espère qu'un jour tu auras la chance de faire, comme moi, ce que tu aimes vraiment. Je toutoume à la foloulou et pour toute la vouvou. Sans toi, je n'aurais pas été la même personne et, au plus profond de moi, il y a un peu de toi qui vit.

A mes grands-parents, qui vont pouvoir enfin cesser de me poser cette question redondante : « et ta thèse ? Tu en es où ? ». Enfin cette fois-ci, elle est terminée !! Merci pour tout votre amour.

A Chalom, mon petit choupinou. Merci pour ton soutien ou plutôt cette chaleur que tu as su apporter en temps voulu sur mes jambes pendant que j'écrivais cette thèse.

A Marylou, (Maïtai), Zozo (Francis, Guy...), pour nos soirées à Toulouse. L'Ubu, le Diagona où j'ai passé les meilleurs moments de mes années Toulousaines. Je vous aime et j'espère que l'aventure ne s'arrêtera pas là. Ma petite Marylou adorée, on est toujours dans le même délire, j'aime faire la fête avec toi. J'espère que notre amitié durera. Zozo, à ta « geek » attitude.

A Miloute, toi que j'ai découverte en Gwada et que depuis nous ne nous sommes plus quittée. J'aime ta fraîcheur et ton amour pour l'aventure. Un jour, on y retournera je l'espère. Je n'oublierai jamais nos petites journées au marché ni nos discussions à Movida même si maintenant je suis à Bordeaux.

A Amandine, pour ton amitié depuis le 1^{er} jour d'école. Pour tous les bons moments passés à Movida et ensuite au club d'escrime. Je t'aime. J'aime ta simplicité, ta gentillesse et ta franchise. A ta positive attitude.

A Estelle, je t'ai rencontrée sur le tard à mon grand regret. Pour tous les repas de l'année dernière où on a refait le monde, merci pour tous tes conseils.

A mes petits poulots, Ximun, Vincent, Françou, pour nos repas avec Amandine et Canari et votre amitié. Je ne vous oublierai jamais.

A Pépé, je serais moins original que toi mais bon je voulais tout de même te rendre hommage. A ton humour décalé qui me fait bien souvent mourir de rire. Tu incarnes la preuve qu'il ne faut jamais se fier aux apparences. Tu sais révéler en chacun, son côté obscur.

A Cassou, pour ton hospitalité durant les inter-écoles et les soirées bien arrosées. Merci, je t'adore.

A Déborah, mon binôme de Bovine. On a bien déliré ensemble.

A Fanny, pour ton insouciance et ta fraîcheur. Je t'adore.

A Canari, le roi de l'ophtalmo. Pour ton humour, ton amitié et merci d'avoir motivé Amandine pour les entraînements d'escrime.

A l'équipe de bovine, Etienne, Béa, Shyk, je n'oublierai jamais le semestre passé ensemble.

A Anne-Claire, ma co-équipière de thèse, pour ton aide durant toute l'expérimentation. Et à notre Jeannette !!

Et à tous les autres, Marion B., Fanny G., Iban, Pauline et Julien.

A Aurélie, ma petite chérie Bordelaise !! Je n'ai trouvé personne qui te ressemble à Toulouse, tu es unique.

A Sabrina, ma petite chérie Toulousaine. A nos petits repas du dimanche soir qui continue toujours. J'espère pouvoir retourner à Seignosse avec toi sans la pluie cette fois !!

Au BEC (Blagnac Escrime Club), Guillaume, Marine, Raphaël, Séb. (ou Touquy), et les autres, pour nos repas, nos délires en compétitions et en entraînement.

Merci à toute l'équipe de pathologie de la reproduction et du bétail pour leur travail, leur aide dans la réalisation de ce travail.

Table des illustrations

Figure 1 : Evolution des moyennes arithmétiques des températures des brebis des lots témoin et inoculés. P. 24

Figure 2 : Comparaison de l'évolution de la moyenne arithmétique de productions laitières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₂₁) et de la brebis n°3044 (avec la bactériologie de cette dernière). P. 26

Figure 3 : Comparaison de l'évolution de la moyenne arithmétique de productions laitières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₁₈) et de la brebis n°3004 (avec la bactériologie de cette dernière). P. 27

Figure 4 : Comparaison de l'évolution du ratio de la moyenne de productions laitières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₂₁) et de la brebis n°3044 (avec la bactériologie de cette dernière). P. 28

Figure 5 : Comparaison de l'évolution du ratio de la moyenne de productions laitières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₁₈) et de la brebis n°3004 (avec la bactériologie de cette dernière). P. 29

Figure 6 : Evolution des moyennes arithmétiques de productions laitières des brebis à excrétion « précoce » (à partir de J₇ ou J₁₁) et « tardive » (postérieure à J₁₈). P. 30

Figure 7 : Evolution des moyennes arithmétiques de productions laitières des brebis des lots inoculés et témoin. P. 31

Figure 8 : Evolution des moyennes géométriques des valeurs de comptage de cellules somatiques (CCS) des héli-mamelles des brebis excrétrices ou non de *Mycoplasma agalactiae* (Ma) des lots inoculés. P. 32

Figure 9 : Comparaison des moyennes géométriques des comptages de cellules somatiques (CCS) et du pourcentage de brebis avec des comptages cellulaires supérieurs à 300 000 cellules/ml, des lots inoculés et témoin. P. 33

Figure 10: Comparaison de l'évolution des moyennes arithmétiques des comptages de cellules somatiques (CCS) des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₂₃) et de la brebis n°3044 (avec la bactériologie de cette dernière). P. 35

Figure 11 : Comparaison de l'évolution des moyennes arithmétiques des comptages de cellules somatiques (CCS) des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₁₈) et de la brebis n°3004 (avec la bactériologie de cette dernière). P. 35

Figure 12 : Evolution des logarithmes de comptages cellulaires (en moyennes géométriques) en fonction du statut excréteur de *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) des lots inoculés (après avoir retiré les infections mammaires non mycoplasmiques). P. 37

Figure 13 : Evolution des logarithmes de comptages cellulaires (en moyennes géométriques) des brebis du lot témoin en fonction de la présence d'infections intra-mammaires (IMI). P. 38

Figure 14 : Répartition des anomalies détectées à l'inspection des mamelles pour les lots témoin et inoculés. P. 39

Figure 15 : Evolution des moyennes arithmétiques des scores individuels des anomalies pour les lots témoin et inoculés (abcès exclus). P. 40

Figure 16 : Evolution des moyennes arithmétiques des scores individuels des anomalies des brebis selon le statut bactériologique et mycoplasmaïque (*Ma*) du lait pour les lots inoculés (abcès inclus). P. 41

Tableau 1 : Moyennes arithmétiques des températures aux pics. P. 25

Tableau 2 : Moyennes géométriques des températures aux pics. P. 25

Tableau 3 : Productions laitières pour chaque héli-mamelle des brebis n°3044 et 3004. P. 27

Tableau 4 : Moyennes géométriques des comptages de cellules somatiques aux pics. P. 34

Tableau 5 : Travaux de reproduction expérimentale de l'infection à *Mycoplasma agalactiae* dans la littérature. P. 43

Liste des abréviations

Ma : Mycoplasma agalactiae

UFC : Unité Formant Colonie

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

PCR : Polymerase Chain Reaction

IMI : Infection Intra-Mammaire

Nll : Nœuds lymphatiques

Table des matières

	Page
Introduction	16
1 Matériels et méthodes	18
1.1 Sélection des animaux	18
1.1.1 Constitution et caractéristiques du troupeau expérimental	18
1.1.2 Constitution des lots témoin et inoculés	18
1.2 Souche de <i>Mycoplasma agalactiae</i> et inoculation	19
1.2.1 Préparation et vérification des inocula	19
1.2.2 Protocole d'inoculation	19
1.3 Conduite des animaux et prélèvements <i>ante mortem</i>	19
1.3.1 Conduite zootechnique	19
1.3.2 Conduite des examens cliniques	20
1.3.3 Protocole de prélèvements et de suivi	21
1.4 Examens et prélèvements nécropsiques	21
1.4.1 Sur les brebis	21
1.4.2 Sur les agneaux	22
1.5 Méthodes analytiques	22
1.5.1 Bactériologie mycoplasmique	22
1.5.2 Bactériologie classique	22
1.6 Statistiques	22
2 Résultats	23
2.1 Analyses bactériologiques	23
2.1.1 Bactériologie mycoplasmique	23
2.1.2 Bactériologie classique	24

2.2	Température	24
2.3	Production laitière	26
2.3.1	Aspect du lait	26
2.3.2	Volume produit	26
2.3.2.1	Comparaison des excrétrices « précoces » et « tardives »	26
2.3.2.2	Comparaison des 3 lots	30
2.4	Comptages cellulaires	32
2.4.1	Valeurs moyennes en fonction de l'excrétion	32
2.4.2	Valeurs moyennes en fonction du lot	33
2.4.3	Valeurs moyennes en fonction de la précocité de l'excrétion	35
2.4.4	Synthèse	37
2.5	Symptômes mammaires	39
2.5.1	Inspection des mamelles	39
2.5.2	Palpations	39
2.5.3	Scores cliniques	40
2.6	Examens et analyses nécropsiques	41
2.6.1	Examen nécropsique des nœuds lymphatiques	41
2.6.2	Recherche de <i>Mycoplasma agalactiae</i> dans les nœuds lymphatiques	42
3	Discussion	43
3.1	Discussion du matériel et des méthodes	43
3.1.1	Sélection et caractéristiques des brebis	43
3.1.2	Conduite zootechnique et expérimentale	45
3.1.3	Protocole d'inoculation	47
3.2	Discussion des résultats	49
3.2.1	Bactériologies classique et mycoplasmique	49
3.2.2	Symptômes cliniques	50

3.2.3	Symptômes mammaires fonctionnels	51
3.2.4	Résultats nécropsiques	53
	Conclusion	56
	Bibliographie	59
	Annexes	61

Introduction

L'agalactie contagieuse est l'une des mycoplasmoses les plus fréquentes chez les ovins et les caprins dans le monde. Cette maladie, décrite depuis au moins 200 ans, est présente sur les cinq continents et particulièrement dans le bassin méditerranéen sous sa forme enzootique (BERGONIER *et al.*, 1997). En France, on la retrouve dans certaines zones difficiles et/ou de montagne, à forte densité ovine ou caprine (filiales laitières) (Pyrénées-Atlantiques et, jusqu'en 2001, Savoie et Haute Savoie). La récente extension de l'agalactie contagieuse au Pays Basque, depuis 2007-2008 (220 élevages touchés), rappelle la grande contagiosité de l'infection, l'importance économique de la maladie et la nécessité de conduire jusqu'à leur terme les programmes de prophylaxie.

Les agents pathogènes responsables de ce syndrome sont des mycoplasmes. Quatre d'entre eux peuvent être impliqués : *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*), *Mycoplasma mycoides capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* et *Mycoplasma putrefaciens*. *Ma*, qui fait l'objet de notre étude, est considérée comme l'agent « classique » (historiquement le premier décrit) de l'agalactie contagieuse ; il est aussi le plus isolé chez les ovins. Différents travaux de reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse ont été publiés. L'importance de cette approche est liée au fait qu'il est nécessaire d'évaluer chez l'hôte naturel le pouvoir pathogène de différentes souches, de différents mutants, ou encore de tester l'effet protecteur de différentes préparations antigéniques. A cet effet, différentes voies d'inoculation ont été utilisées pour reproduire l'infection ou la maladie. La voie intra-mammaire a été utilisée à deux reprises, *Ma* présentant un tropisme majeur pour la mamelle (SANCHIS *et al.*, 1999, thèse de doctorat vétérinaire de GALISSON, 2001). L'étude de MACOWAN *et al.* (1984) a comparé la virulence de 2 souches de *Ma* selon la voie d'inoculation utilisée chez l'agneau : intraveineuse, intra-trachéale, sous-cutanée, intra-nasale. Dans l'étude de SANCHIS *et al.* (1998), la voie conjonctivale a été utilisée pour étudier les premières étapes de l'infection, tandis que BUONAVOGLIA *et al.* (1999) ont comparé les voies conjonctivale et intra-nasale. Au total, seuls 4 travaux se sont intéressés à l'inoculation de *Ma* à des brebis en lactation (dont 2 en dehors de l'ENVV). Pour ces dernières, les titres des inocula ont toujours été élevés (10^8 à 10^9 UFC) et les souches locales. La littérature peut donc paraître peu abondante sur ce sujet, hétérogène (4 voies et souches différentes pour 4 articles et thèses), et les inocula peu représentatifs des conditions naturelles sur le plan quantitatif. Inversement, une référence commune ne peut être donnée puisque la souche-type internationale n'a pas été utilisée chez les ovins.

Dans ce contexte, le but de notre étude était de tenter de valider un protocole expérimental (voie d'inoculation et titre avec la souche de référence, stade physiologique des animaux, durée d'étude), et des critères d'évaluation clinique et bactériologique, donnant de façon répétable et, si possible, représentative de la maladie naturelle, un profil infectieux voire clinique adapté aux expérimentations de reproduction de l'agalactie contagieuse.

Dans notre étude, deux lots de brebis laitières suitées, en début de lactation, ont ainsi été inoculés avec respectivement 10^3 et 10^5 UFC de la souche de référence internationale de *Ma*.

1 Matériels et méthodes

1.1 Sélection des animaux

1.1.1 Constitution et caractéristiques du troupeau expérimental

Les brebis ont été sélectionnées sur différents critères :

- Race : Lacaune mixte (laitière et allaitante). Les brebis provenaient d'un élevage unique en zone indemne d'agalactie contagieuse sur le plan clinique et sérologique. Un dépistage individuel initial, de nature clinique, bactériologique et sérologique a été réalisé.
- Stade physiologique : en début de lactation (l'inoculation a été réalisée dans le premier mois de lactation). Les brebis ont mis bas dans les locaux expérimentaux ; les agneaux ont été laissés sous la mère.
- Etat clinique : absence de symptômes mammaires, oculaires, articulaires et généraux.
- Etat bactériologique : les analyses bactériologiques réalisées sur le lait à J₋₁₀ et J₀ ont révélé des infections mammaires subcliniques non mycoplasmiques préexistantes chez plusieurs brebis. L'écouvillonnage nasal et auriculaire de toutes les brebis, ayant donné lieu à une recherche de mycoplasmes, n'a pas permis l'isolement de *Ma*.
- Etat sérologique : séronégativité (ELISA) vis-à-vis de la brucellose, de la border disease et de l'agalactie contagieuse à *Ma* (ELISA P48, Idexx-Pourquier), par prise de sang à la jugulaire réalisée à J₋₂₀ sur les brebis (et les agneaux). Six brebis sur 27 en début d'expérimentation (avant allotement) étaient séropositives vis-à-vis du Visna-Maedi (ELISA).

1.1.2 Constitution des lots témoin et inoculés

Au vu des résultats bactériologiques à J₋₁₀ et J₀, le choix des brebis pour constituer les lots s'est effectué sur le critère présence ou absence de mammite subclinique. Les brebis présentant une mammite ont été placées dans le lot témoin en priorité. Trois ont été placées dans les lots inoculés.

- Le lot témoin était composé de 6 brebis et leurs agneaux. La brebis n°0036 a été exclue au cours de l'expérimentation car elle présentait une mammite à *Staphylococcus aureus*, mais a été remplacé à J₅ par la brebis n°2027.

- Le lot inoculé a été divisé en 2 : un lot de 5 brebis et leurs agneaux, inoculées à 10^3 UFC, et un autre de 5 brebis et leurs agneaux inoculées à 10^5 UFC.

1.2 Souche de *Mycoplasma agalactiae* et inoculation

1.2.1 Préparation et vérification des inocula

La souche utilisée était la souche de référence internationale PG₂.

Le dénombrement et la préparation des inocula ont été réalisés à l'avance, par ensemencement et lecture sur géloses de milieu spécifique pour mycoplasmes (SP4). Plusieurs dilutions décimales de PG₂ ont ainsi été dénombrées, et des cultures des titres souhaités ont été préparées par dilution : 10^3 et 10^5 UFC. Des fractions aliquotes de ces cultures initiales titrées ont été placées à -80°C .

Le jour des inoculations, les fractions aliquotes ainsi préparées ont été décongelées et aspirées dans des seringues stériles, avec 4 seringues en excès par rapport au nombre de brebis à inoculer. Une vérification des titres effectivement inoculés a été réalisée à partir de ces seringues par la technique du dénombrement après culture de dilutions décimales (géloses SP4). Les titres obtenus ont respectivement été de 10^3 et 10^5 UFC.

1.2.2 Protocole d'inoculation

Le volume inoculé a été le même pour toutes les brebis quelque soit le lot : 1,5 ml. Le lot témoin a reçu un bouillon stérile de même volume.

L'inoculation a été réalisée par voie sous-cutanée, en avant de l'épaule gauche, au tiers moyen de l'encolure, après tonte et désinfection du site d'injection le 17/11/08.

1.3 Conduite des animaux et prélèvements *ante mortem*

1.3.1 Conduite zootechnique

Les lots inoculés et témoins étaient dans des bâtiments séparés. Les lots inoculés ont été placés dans deux boxes selon le titre de l'inoculum. Les brebis évoluaient dans des boxes paillés avec leurs agneaux respectifs. Les brebis et les agneaux ont été nourris avec du foin distribué à volonté et des concentrés à raison de 250 g/brebis, 2 fois par jour. Lors de la

séparation mère-agneaux (veille de prélèvement), les agneaux étaient nourris avec des concentrés « starter » distribués à volonté.

1.3.2 Conduite des examens cliniques

- Examen général :
 - Observation de l'état général des brebis (abattement, isolement, appétit...).
 - Prise de température rectale (à l'aide d'un thermomètre électronique).
- Mamelles :
 - Inspection : évaluation et codification standardisée des déséquilibres latéro-latéraux (différence de volumes entre les héli-mamelles).
 - Palpation : détection de signes de mammite aiguë (rougeur, chaleur et tuméfaction diffuse ou focale) et chronique (foyers d'induration, abcès) ; palpation des nœuds lymphatiques rétro-mammaires.
- Production laitière :
 - Observation de l'aspect du lait (couleur, consistance).
 - Mesure de la production par brebis et par héli-mamelle : les agneaux étaient séparés de leur mère la veille des mesures en commençant par le lot témoin puis par les lots inoculés à 10^3 puis à 10^5 UFC. Ils étaient isolés dans 3 boxes en respectant les différents lots. Les mamelles étaient vidangées au maximum. L'opération était réalisée vers 19h pour une évaluation de la production le lendemain matin à heure fixe avec la même organisation pour obtenir un temps de séparation des agneaux et des mères à peu près constant.
- Comptages cellulaires : réalisés sur le lait de chaque héli-mamelle (1^{ers} jets).
- Articulations : inspection et palpation des articulations du carpe et du tarse en particulier, et recherche d'éventuelles boiteries sur les agneaux et les brebis.
- Yeux : inspection de la cornée, de la conjonctive palpébrale et oculaire et des sécrétions.

1.3.3 Protocole de prélèvements et de suivi

- Nature des prélèvements :
 - Lait de chaque hémi-mamelle pour les comptages cellulaires et pour les bactériologies.
 - Ecouvillons nasaux et auriculaires pour la recherche de mycoplasmes (J₂₀).
- Organisation des suivis sur une semaine-type (durant 4 semaines) :
 - Mesure de production laitière : réalisée deux fois par semaine, le lundi et le vendredi de chaque semaine pendant trois semaines.
 - Comptages cellulaires, bactériologie sur le lait : réalisés trois fois par semaine, les lundi, mercredi et vendredi de chaque semaine pendant quatre semaines. A J₃, il a été réalisé un prélèvement de lait pour effectuer un comptage cellulaire ainsi qu'à J₁₀ pour une bactériologie classique sur le lait.
 - Prise de température : réalisée cinq fois par semaine, les dimanche soir, lundi matin, mercredi, jeudi soir et vendredi matin de chaque semaine pendant quatre semaines.

1.4 Examens et prélèvements nécrosiques

1.4.1 Sur les brebis

- Brebis concernées : dans les lots inoculés, toutes les brebis ont été autopsiées, ainsi qu'une brebis dans le lot témoin.
- Organes et tissus : compte-tenu des résultats *ante mortem*, nous nous sommes uniquement intéressés aux nœuds lymphatiques (rétro-mammaires, pré-scapulaire gauche, axillaire gauche, iliaques, rétro-pharyngiens, parotidiens, médiastinaux et mésentériques).
 - Examen macroscopique : modification de taille, d'aspect extérieur et à la coupe.
 - Prélèvements bactériologiques aseptiques, avec changement de lame stérile à chaque prélèvement, pour les analyses mycoplasmiques.

1.4.2 Sur les agneaux

- Animaux concernés : 3 agneaux des lots inoculés dont les mères ont été fortement et précocement excrétrices de *Ma* (n°3044 et 3004).
- Euthanasie avec du Doléthal® (voie intraveineuse).
- Organes et tissus : prélèvements des nœuds lymphatiques (rétro-mammaires, pré-scapulaire gauche, axillaire gauche, iliaques, rétro-pharyngiens, parotidiens, médiastinaux et mésentériques) avec la même procédure que pour les brebis.

1.5 Méthodes analytiques

1.5.1 Bactériologie mycoplasmique

Les cultures ont été réalisées en milieu solide sur géloses SP4, après enrichissement en milieux liquides spécifiques pour mycoplasmes (SP4 également, 1 bouillon au 1/10^{ème} et 1 autre au 1/100^{ème}). Après 3 à 4 jours de culture, 50 µl étaient étalés, puis les boîtes de Pétri étaient placées à l'étuve à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂. La lecture se faisait de J₂ à J₅ par observation à la loupe binoculaire (DAMASSA *et al.*, 1992).

Les PCR ont été réalisées après culture en milieu liquide (SP4) pendant une semaine, à l'aide des amorces *polC* (MARENDA *et al.*, 2005).

1.5.2 Bactériologie classique

Les méthodes d'isolement et d'identification conventionnelles ont été appliquées : utilisation de géloses au sang de mouton et de galeries API à 20 ou 32 caractères, selon les recommandations du fabricant.

1.6 Statistiques

Les tests suivants ont été utilisés : chi 2 ou chi 2 corrigé de Yates, test t de Student.

2 Résultats

2.1 Recherche bactériologique

2.1.1 Bactériologie mycoplasmique (cf. annexe 1)

- Ecouvillons oculaires et auriculaires :

La recherche des mycoplasmes à partir d'écouvillons nasaux et auriculaires, réalisée avant inoculation (J₋₂₀), n'a permis aucun isolement de *Ma*. En revanche, *Mycoplasma arginini* et *Mycoplasma ovipneumoniae* ont été isolés, à partir de la cavité nasale, chez respectivement 3 et 4 brebis.

- Lait :

Les résultats suivants ont été obtenus après inoculation.

Dans le lot inoculé avec 10³ UFC, toutes les femelles ont excrétées *Ma* dans le lait entre J₁₁ et J₂₃, sauf la brebis n°2006 pour laquelle seul un résultat douteux a été obtenu à J₂₁ (gauche). Sur les 5 brebis, seule la brebis n°3044 a excrété précocement et durablement (J₁₁-J₂₈) dans le lait. Une excrétion bilatérale de *Ma* a été mise en évidence pour la n°3044 et n°2015, de manière différée pour la première (J₁₁ et J₂₃) et en même temps pour la seconde à J₂₃. Chez les autres brebis excrétrices, *Ma* a été isolé uniquement sur le lait issu de l'hémi-mamelle droite. Dans le lot inoculé avec 10⁵ UFC, toutes les femelles ont excrétées *Ma* dans le lait entre J₇ et J₂₅, sauf la brebis n°2023 pour laquelle aucune bactériologie positive n'a été obtenue. Une excrétion bilatérale, précoce et durable a été mise en évidence chez la brebis n°3004 (J₇ et J₁₆). Chez les autres brebis excrétrices, *Ma* a été isolé uniquement sur le lait issu de l'hémi-mamelle gauche.

Au total, pour les 2 groupes de brebis, et en intégrant le résultat douteux de la brebis n°2006, l'excrétion galactophore :

- a concerné 9 brebis sur 10
- a été unilatérale pour 6 brebis sur 9 (4 fois à gauche, côté de l'inoculation)
- a été principalement ou exclusivement mise en évidence à gauche pour 6 brebis sur 9 (en intégrant les brebis positives des 2 côtés)
- a permis de différencier 2 groupes de brebis positives dans le lait :
 - brebis excrétant précocement (à partir de J₇ ou J₁₁) et durablement (jusqu'à J₂₈, date de l'euthanasie) : 2 femelles

- brebis excrétaant tardivement (J₁₈ à J₂₅) et ponctuellement (6 cas sur 7) : 7 femelles. Le passage à une excrétaion bilatérale (et ponctuelle) pour les 2 brebis à excrétaion unilatérale précoce s'est aussi fait tardivement

Sur le critère du nombre de brebis-date positives (intégrant le nombre d'hémi-mamelles excrétrices, la précocité et la durée), l'excrétaion du lot inoculé avec 10³ UFC est supérieure au second lot (p = 0,62, non significatif).

2.1.2 Bactériologie classique (cf. annexe 2)

Dans le lot témoin, 3 brebis ont présenté des infections intra-mammaires durables (J₀ ou J₇ à J₂₈) : brebis n° 2010 (gauche et droite), 2014 (gauche et droite) et 2049 (droite). Quatre de ces 5 infections étaient dues à un staphylocoque à coagulase négative, et la cinquième à *Escherichia coli* (*E. coli*). Une 4^{ème} brebis a présenté un isolement streptococcique (J₁₄). Les 2 dernières étaient bactériologiquement négatives (3024 et 1033).

Dans le lot inoculé avec 10³ UFC, deux infections subcliniques durables ont été observées : brebis n°3044 (à gauche, J₀ à J₁₄) et 2015 (à droite, J₀ à J₂₈) respectivement infectées par *E. coli* et un staphylocoque à coagulase négative.

Dans le lot inoculé avec 10⁵ UFC, deux infections intra-mammaires subcliniques durables ont également été observées : brebis n°1067 (à gauche, J₀ à J₂₁) et 3004 (à gauche, J₀ à J₂₈). Un staphylocoque à coagulase négative a été régulièrement isolé dans les 2 cas.

2.2 Température

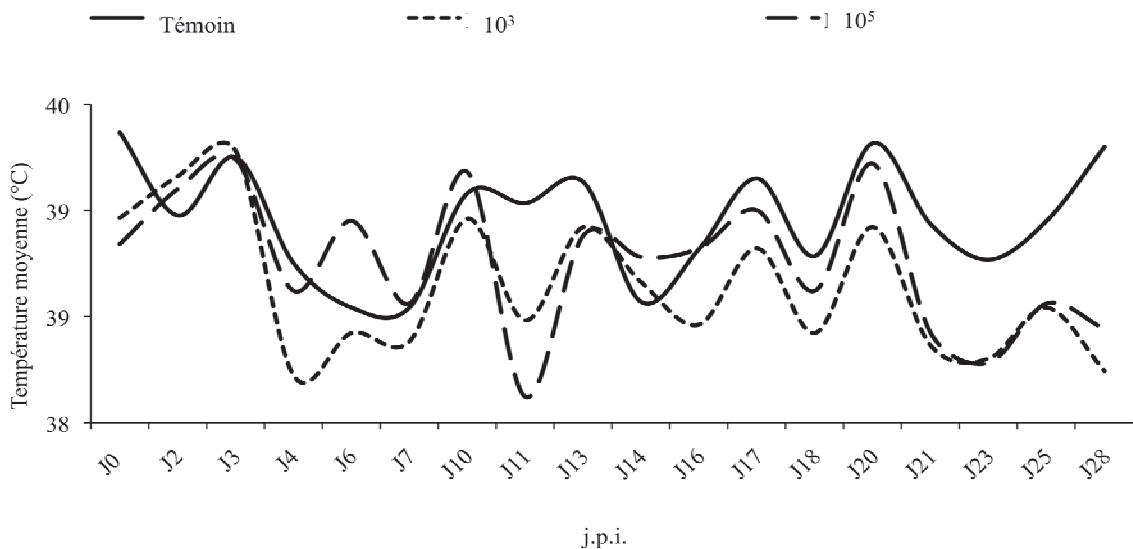


Figure 1 : Evolution des moyennes arithmétiques des températures des brebis des lots témoin et inoculés.

La moyenne arithmétique des températures, tous lots confondus, est toujours inférieure à 39,5°C. Sur les 2 lots inoculés, les moyennes des températures suivent des évolutions similaires de type sinusoïdal, avec plusieurs pics. Sur les 28 jours de suivi, les 2 lots inoculés ont présentés 7 pics concomitants, d'intensité variable, avec une période de 3 à 5 jours. Cinq à 6 de ces pics ont également été enregistrés pour le lot témoin.

Tableau 1 : Moyennes arithmétiques des températures aux pics (cf. figure 1).

Lot	J ₂	J ₆	J ₁₀	J ₁₃	J ₁₇	J ₂₀	J ₂₈
Témoin	39,0	38,5	39,1	39,1	39,2	39,3	39,3
10 ³ UFC	39,2	38,4	39,0	38,9	38,8	38,9	38,2
10 ⁵ UFC	39,1	39,0	39,2	38,9	39,0	39,2	38,4

Tableau 2 : Moyennes géométriques des températures aux pics (cf. figure 1).

Lot	J ₂	J ₆	J ₁₀	J ₁₃	J ₁₇	J ₂₀	J ₂₈
Témoin	39,0	38,5	39,1	39,1	39,1	39,3	39,3
10 ³ UFC	39,2	38,4	39,0	38,9	38,8	38,9	38,2
10 ⁵ UFC	39,1	38,9	39,2	38,9	39,0	39,2	38,4

Au niveau individuel, dans tous les lots, des brebis ont présenté, ponctuellement, des températures supérieures à 39,5°C. Dans le lot témoin, plus de 80% des brebis a présenté une température supérieure à ce seuil au moins 1 fois. Pour les lots inoculés, 60% et 40% des brebis, respectivement, pour le lot inoculé avec 10³ UFC et avec 10⁵ UFC. Dans les 2 lots inoculés, 8% des valeurs, au cours de l'ensemble de l'expérimentation, ont été supérieures à 39,4°C (19% pour le lot témoin, présentant des infections intra-mammaires non mycoplasmiques). Ces valeurs supérieures à 39,4°C ont concerné 8 brebis sur 10 (de 1 à 4 fois au cours du suivi). Le premier de ces pics est survenu entre J₀ et J₃ pour 6 de ces brebis. L'apparition de valeurs supérieures à 39,4°C n'a été, grossièrement, concomitante du début de l'excrétion que pour 1 ou 2 brebis (sur 8).

2.3 Production laitière

2.3.1 Aspect du lait

Il n'y a pas eu de modification de l'aspect du lait hormis la brebis n°1033 (lot témoin) qui a excrété un lait avec des grumeaux à J₄. Les autres brebis ont présenté un lait d'aspect normal durant toute l'expérimentation.

2.3.2 Volume produit

2.3.2.1 Comparaison des excrétrices « précoces » et « tardives »

- Productions brutes :

Les 2 graphiques ci-dessous représentent l'évolution des moyennes arithmétiques des productions laitières. Dans chaque lot, une brebis a présenté une excrétion précoce de *Ma* (cf. annexe 1, excrétion précoce), leur production laitière a donc été comparée à celle des brebis ayant excrété plus tardivement (excrétion tardive).

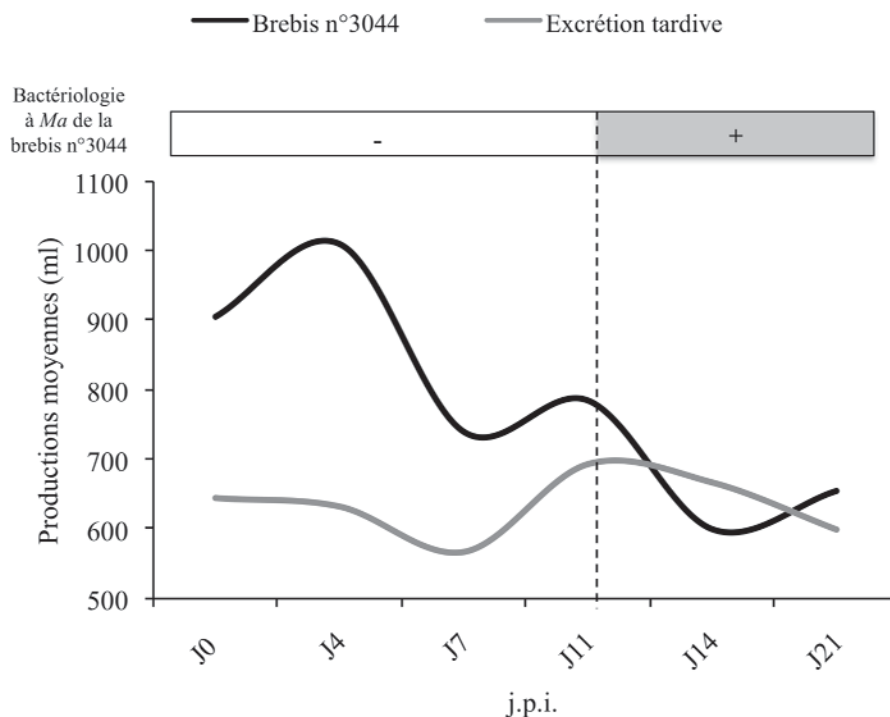


Figure 2 : Comparaison de l'évolution de la moyenne arithmétique de productions laitières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₂₁) et de la brebis n°3044 (avec la bactériologie de cette dernière).

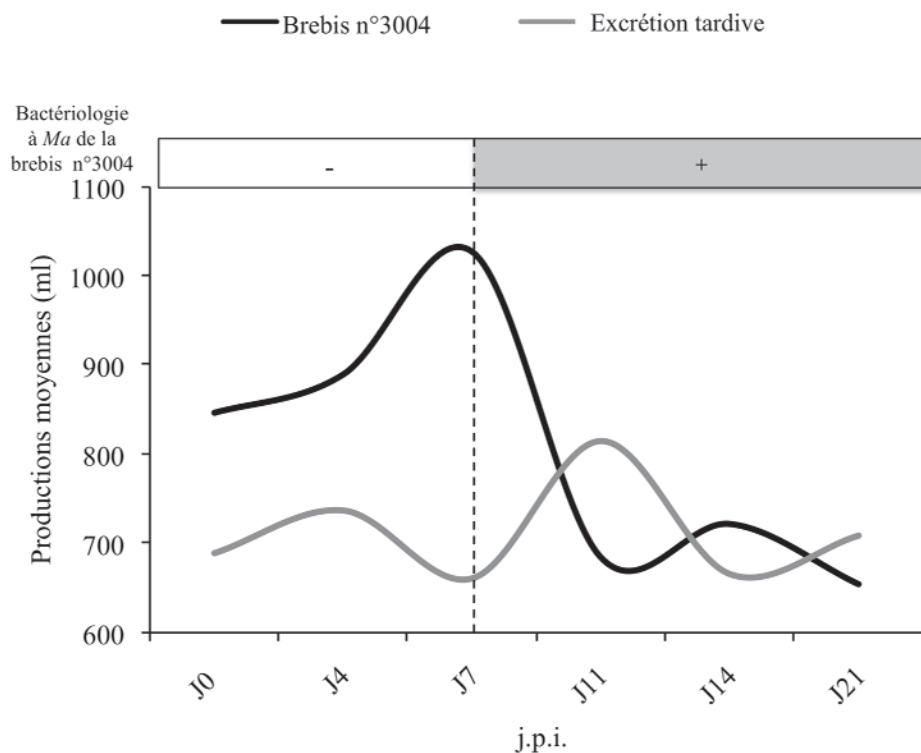


Figure 3 : Comparaison de l'évolution de la moyenne arithmétique de productions lactières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₁₈) et de la brebis n°3004 (avec la bactériologie de cette dernière).

La courbe des productions lactières des 2 brebis à excrétion « précoce » présente une augmentation (12%) de J₀ à J₄ (Brebis n°3044) et de J₀ à J₇ (Brebis n°3004)(22%) et surtout une chute brutale jusqu'à J₁₄ (Brebis n°3044) (41%) et J₁₁ (Brebis n°3004) (33%). Notons que la production lactière à J₂₁ de la brebis n°3044 pour l'hémi-mamelle gauche n'était que de 75 ml, et de 155 ml pour celle de la brebis n°3004.

Tableau 3 : Productions lactières pour chaque hémi-mamelle des brebis n°3044 et 3004.

Lot	Brebis	Côté	J ₀	J ₄	J ₇	J ₁₁	J ₁₄	J ₂₁
10 ³ UFC	N°3044	G	445	535	345	295	465	75
		D	1365	1485	1135	1275	735	1235
10 ⁵ UFC	N°3004	G	745	865	795	435	380	155
		D	945	915	1260	935	1065	1155

En ce qui concerne les courbes des brebis à excrétion « tardive », on note :

- pour le lot inoculé à 10^3 UFC, les productions lactières diminuent légèrement de J_0 à J_7 suivi d'un pic de moyenne de production à J_{11} (693,3) avec nouvelle diminution entre J_{11} et J_{21} .
- pour le lot inoculé à 10^5 UFC, les productions lactières augmentent légèrement de J_0 à J_4 puis chutent brutalement jusqu'à J_7 (10%). Un pic de moyenne de production (815) suivi d'une nouvelle diminution est observé entre J_{11} et J_{14} (18%).

- Ratios de production par comparaison aux valeurs initiales :

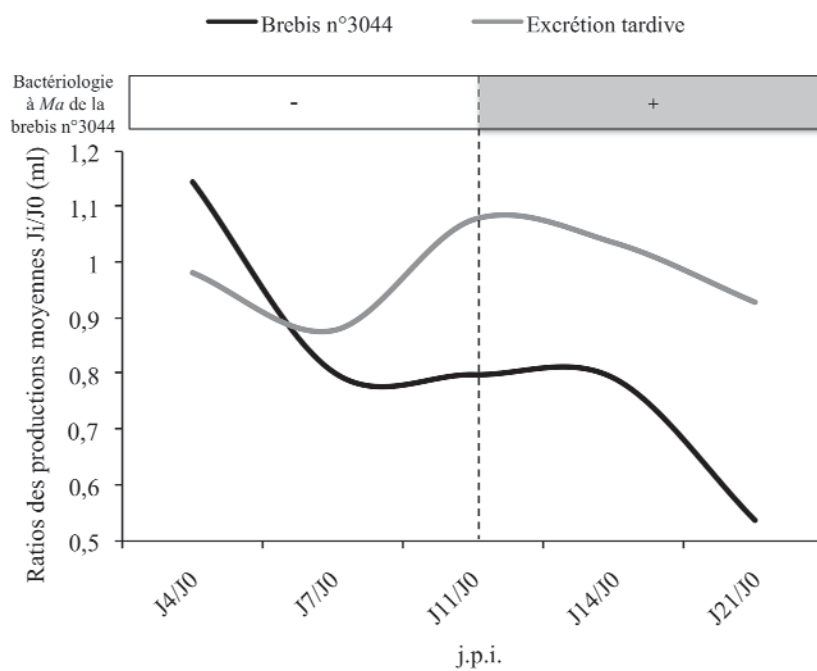


Figure 4 : Comparaison de l'évolution du ratio de la moyenne de productions lactières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J_{21}) et de la brebis n°3044 (avec la bactériologie de cette dernière).

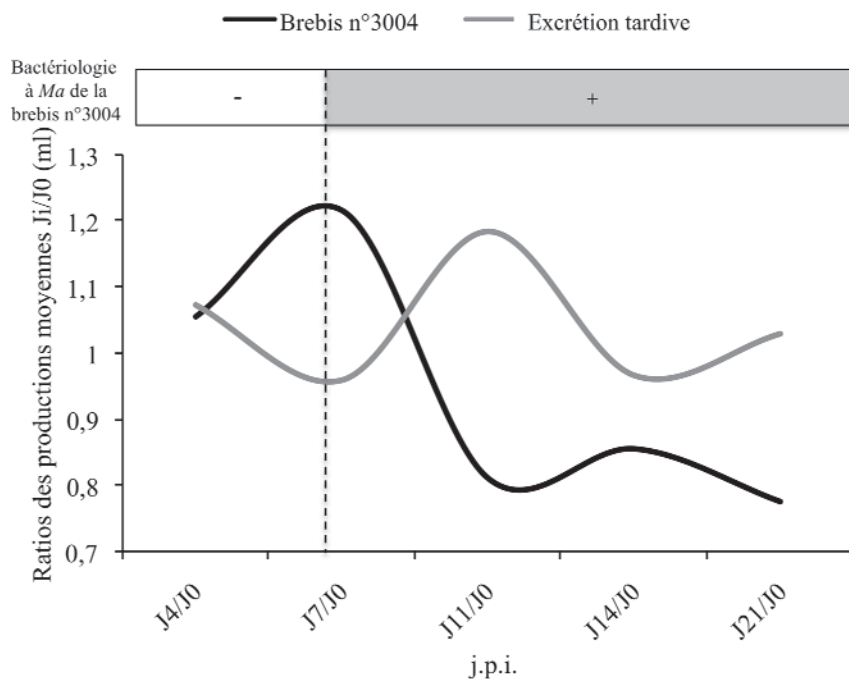


Figure 5 : Comparaison de l'évolution du ratio de la moyenne de productions lactières des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₁₈) et de la brebis n°3004 (avec la bactériologie de cette dernière).

Sur ces 2 graphiques n°4 et 5, on retrouve les mêmes tendances de productions lactières que les 2 précédents. On note pour la brebis n°3044, une chute brutale de la production à J₄ qui se normalise pour diminuer de nouveau à J₁₄. Chez la brebis n°3004, il est mis en évidence une augmentation de production jusqu'à J₇ suivie d'une diminution importante jusqu'à J₁₁.

Les courbes de moyennes de production lactière des brebis à excrétion « tardive » ont des évolutions similaires aux graphiques précédents.

2.3.2.2 Comparaison des 3 lots

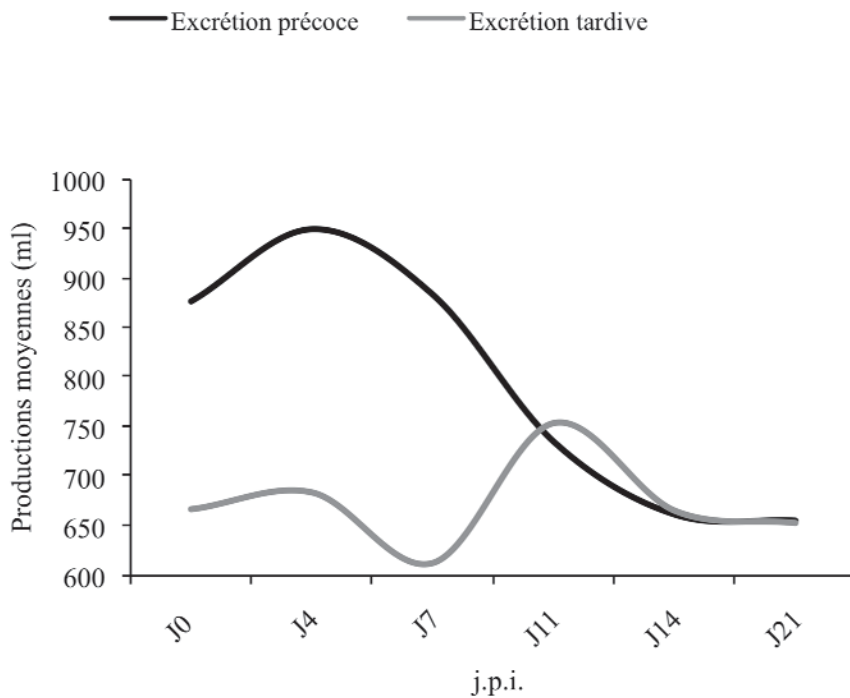


Figure 6 : Evolution des moyennes arithmétiques de productions lactières des brebis à excrétion « précoce » (à partir de J₇ ou J₁₁) et « tardive » (postérieure à J₁₈).

En s'affranchissant du lot, les brebis à excrétion « précoce » ont présenté entre J₀ et J₄ une augmentation de la moyenne des productions lactières (9%), puis une diminution progressive et constante jusqu'à J₂₁ (31%).

La moyenne des productions lactières des brebis à excrétion « tardive » a présenté 2 pics à J₄ et J₁₁ (684,2 et 754,2) puis a chuté progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation (13%). Si l'on compare la figure 6 à l'évolution des moyennes de productions lactières des lots inoculés (figure 7, ci-dessous), on remarque l'évolution sinusoïdale de la production lactière avec les 2 pics de J₄ (753 et 727) et J₁₁ (716,3 et 748) se rapprochant davantage de l'évolution décrite pour les brebis à excrétion « tardive ».

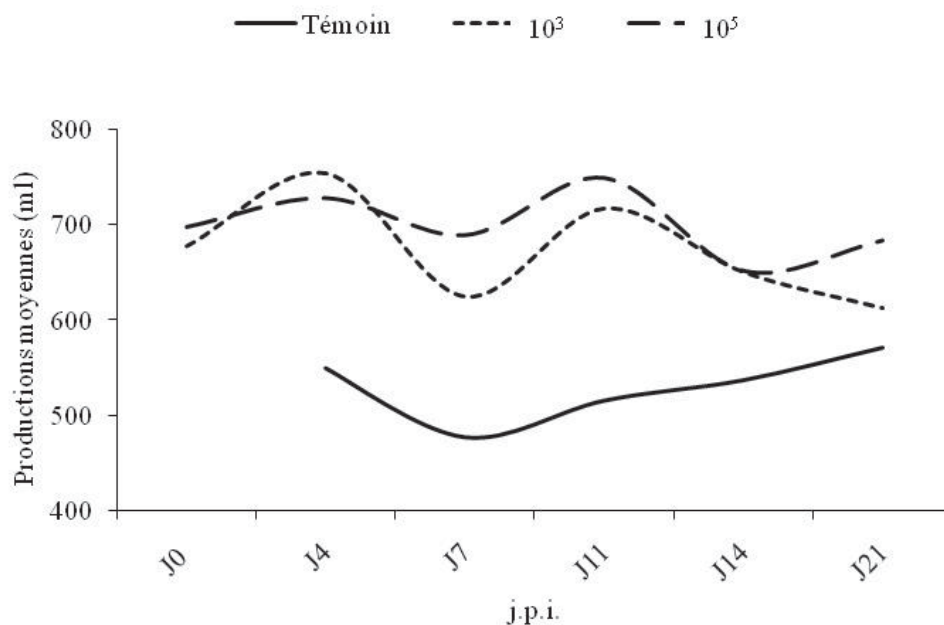


Figure 7 : Evolution des moyennes arithmétiques de productions lactières des brebis des lots inoculés et témoin.

Concernant le lot témoin, on observe une chute de la production entre J₄ et J₇ (13%) jusqu'à un minimum (476,9), puis la moyenne des productions lactières augmente progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation (20%).

Ainsi, tant à 10³ qu'à 10⁵ UFC, si l'on exclu les 2 brebis n°3044 et 3004 (excrétion « précoce »), il n'est pas apparu de chute de production moyenne dans les 21 jours suivant les inoculations. La production lactière du lot inoculé avec 10⁵ UFC a même été légèrement supérieure à celle du second lot sur l'ensemble de la période expérimentale. La comparaison des productions lactières après inoculation (J₄ à J₂₁), en fonction des lots, a montré des valeurs de 6,73 l pour le lot inoculé à 10³ UFC, 6,99 l pour le lot à 10⁵ UFC et 4,9 l pour le lot témoin (somme des productions lactières de chaque date). La différence entre le lot témoin et les lots inoculés est significative ($p < 0,012$ pour 10³ UFC et $p < 0,049$ pour 10⁵ UFC). La différence entre les lots inoculés ne l'est pas ($p = 0,787$).

De même, la comparaison des productions lactières (J₄ à J₂₁) des hémimamelles en fonction de leur statut excréteur de *Ma* a montré des moyennes arithmétiques de 3,47 l pour les positives et de 3,37 l pour les négatives ($p = 0,84$, différence non significative).

Inversement, à l'échelon individuel (derrière ces moyennes), 6 hémimamelles ont présenté entre J₀ et J₂₁ une chute plus ou moins importante de la production lactière (concerne 2 brebis de chaque lot). Dans les 6 cas, *Ma* a été isolé au moins 1 fois. La proportion d'hémimamelles

excrétrices de *Ma* parmi celles qui ne présentent pas de chute de production a été de 5 sur 12 (différence non significative).

2.4 Comptages cellulaires :

2.4.1 Valeurs moyennes en fonction de l'excrétion

Dans le graphique ci-dessous, on a comparé les moyennes géométriques de comptage cellulaire des héli-mamelles excrétrices ou non excrétrices chez les brebis des deux lots inoculés (cf. annexe 1).

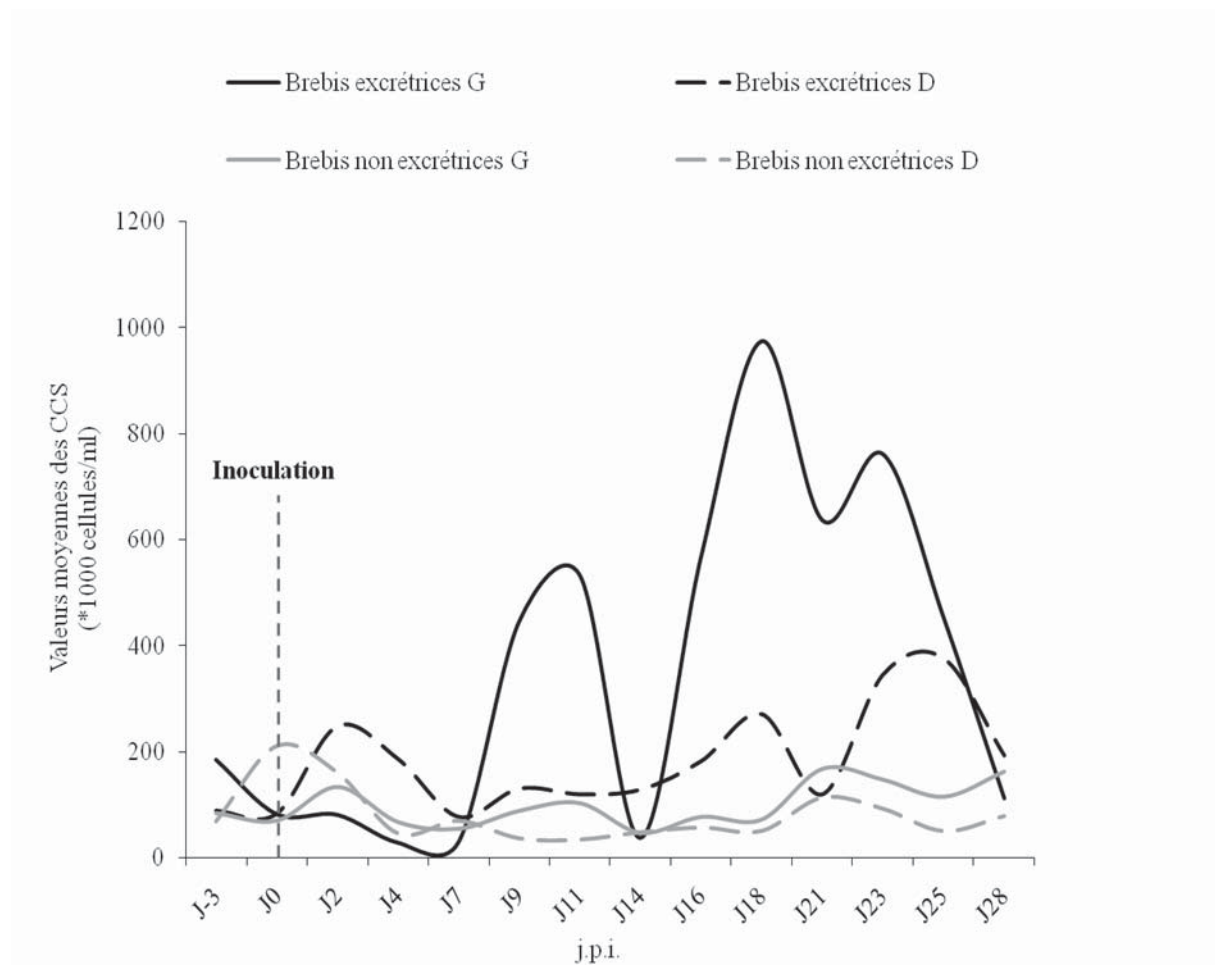


Figure 8 : Evolution des moyennes géométriques des valeurs de comptage de cellules somatiques (CCS) des héli-mamelles des brebis excrétrices ou non de *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) des lots inoculés.

Les valeurs des héli-mamelles excrétrices sont plus élevées que celles des non excrétrices, à gauche comme à droite. La courbe des brebis excrétrices à gauche présente des valeurs plus élevées, avec des moyennes presque toujours supérieures à 300 000 cellules/ml. La courbe des

brebis excrétrices à droite montre une élévation des moyennes des comptages cellulaires à J₂₃ pour atteindre 376 595 cellules/ml à J₂₅.

En parallèle, les résultats d'isolement de *Ma* ont montré que les excréctions ont souvent intéressé l'hémi-mamelle gauche.

Les comptages cellulaires des brebis n°2015 et n°1067 ont été retirés puisqu'ils pouvaient être biaisés par la présence d'autres bactéries dans la mamelle (cf. annexe 2).

2.4.2 Valeurs moyennes en fonction du lot

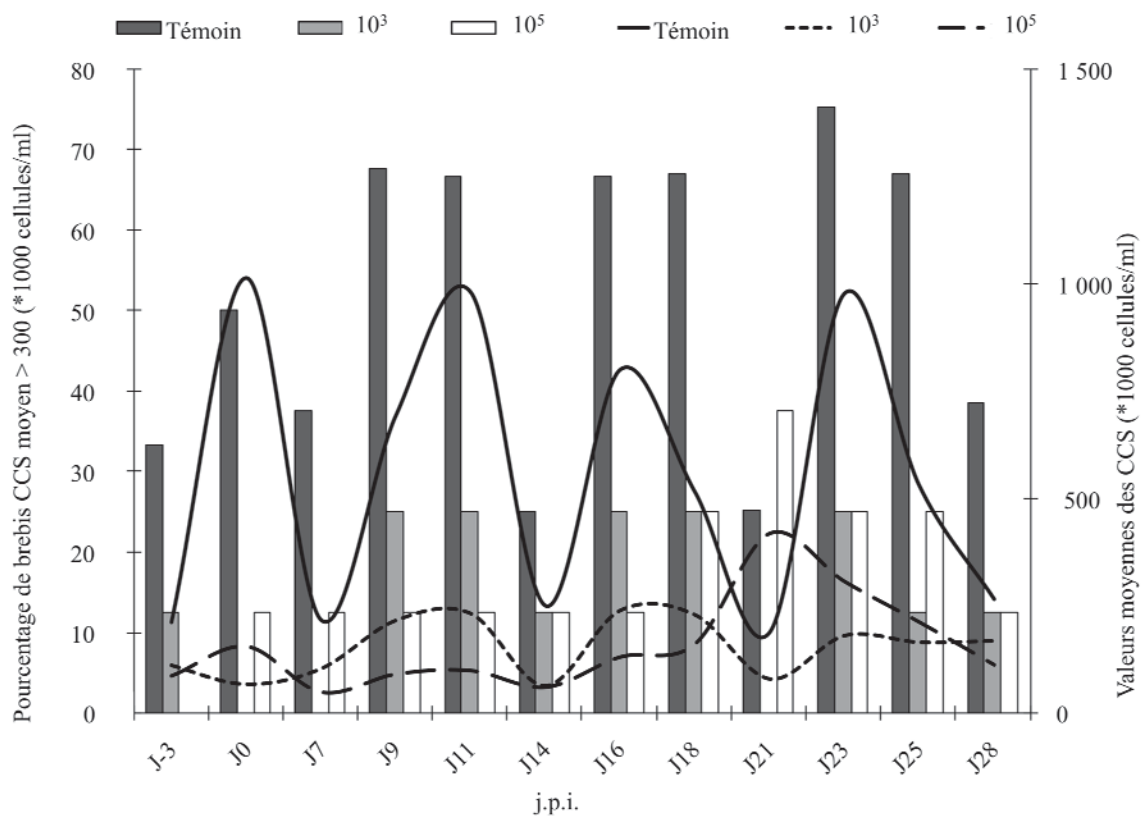


Figure 9 : Comparaison des moyennes géométriques des comptages de cellules somatiques (CCS) et du pourcentage de brebis avec des comptages cellulaires supérieurs à 300 000 cellules/ml, des lots inoculés et témoin.

On notera que les comptages des cellules somatiques des brebis n°2015 et n°1067 ont été retirés, ainsi que les valeurs de comptage cellulaire des brebis présentant un isolement bactérien (non mycoplasmaïque) à une date donnée.

Pour les 3 lots, on remarque l'évolution sinusoïdale des moyennes de comptage cellulaire avec 3 à 4 pics, avec une période de 5 à 10 jours.

Tableau 4 : Moyennes géométriques des comptages de cellules somatiques aux pics (cf. figure 9) (en gras).

Lot	J ₀	J ₁₁	J ₁₆	J ₂₁	J ₂₃
Témoin	1014	981	800	188	978
10 ³ UFC	67	232	239	80	180
10 ⁵ UFC	155	99	130	418	306

Pour le lot témoin, 4 pics dépassant les 300 000 cellules/ml ont été enregistrés, ainsi que les plus importants pourcentages de brebis avec des comptages cellulaires supérieurs à 300 000 cellules/ml : ils oscillent entre 33 et 75% sur toute la durée de l'expérimentation (sauf à J₁₄ et J₂₁ : 25%). Rappelons que toutes les brebis de ce lot ont présenté, au moins à une date donnée, un isolement de bactéries dans le lait, si l'on englobe les résultats de J₋₁₀.

Le lot inoculé avec 10³ UFC a présenté 3 pics jusqu'à J₂₃ et toujours inférieurs à 300 000 cellules/ml. Durant l'expérimentation, à chaque mesure, au maximum 25% des brebis (*i.e.* 2 hémi-mamelles) ont présenté un comptage cellulaire supérieur à 300 000 cellules/ml. Les hémi-mamelles concernées, aux pics, ont été :

- la gauche des brebis n°1059 et 3044 à J₁₁
- la gauche et droite de la brebis n°3044 à J₁₆
- la gauche de la brebis n° 2006 et la droite de la 3044 à J₂₃

On remarquera que la brebis n°3044 a régulièrement présenté des comptages cellulaires supérieurs à 300 000 cellules/ml au cours de l'expérimentation ; à partir de J₂₁ cependant, l'hémi-mamelle gauche ne fournissait plus assez de lait pour réaliser cette mesure.

Le lot inoculé avec 10⁵ UFC a présenté 3 pics, dont deux inférieurs à 300 000 cellules/ml (sauf à J₂₁). A chaque pic, au maximum 13% des brebis (*i.e.* 1 hémi-mamelle) ont présenté un comptage cellulaire supérieur à 300 000 cellules/ml sauf à J₂₁ où cela concernait 38% des brebis. Les hémi-mamelles concernées, aux pics, ont été :

- la droite de la brebis n°3065 à J₀
- la gauche de la brebis n°3004 à J₁₁
- la gauche et droite de la brebis n°3004 et la gauche de la brebis n°2023 à J₂₁

On notera que la brebis n°3004 a régulièrement présenté des comptages cellulaires supérieurs à 300 000 cellules/ml au cours de l'expérimentation.

2.4.3 Valeurs moyennes en fonction de la précocité de l'excrétion

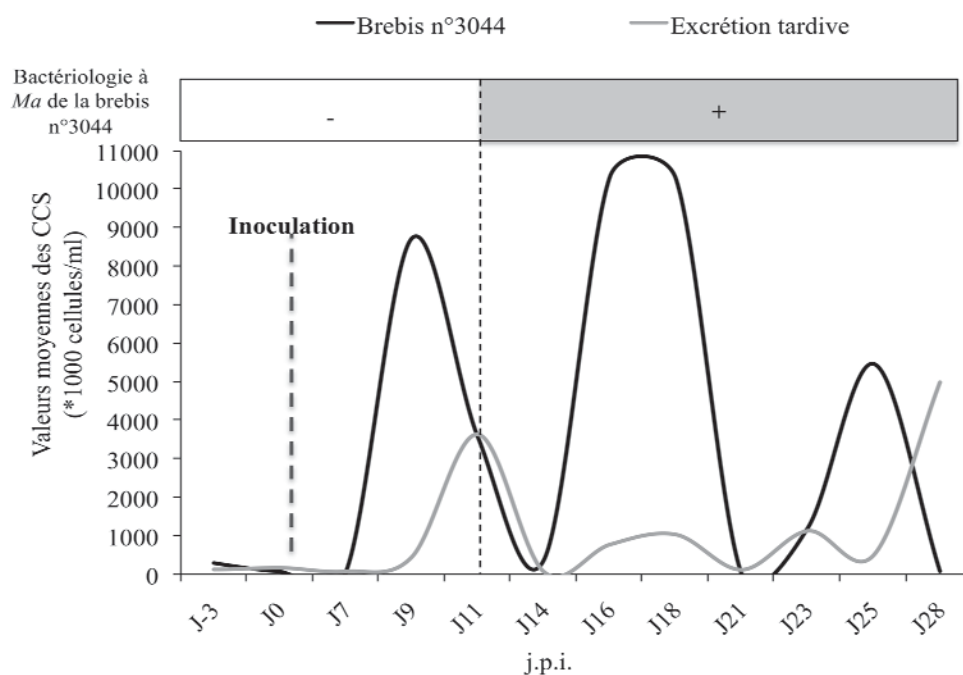


Figure 10: Comparaison de l'évolution des moyennes arithmétiques des comptages de cellules somatiques (CCS) des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₂₃) et de la brebis n°3044 (avec la bactériologie de cette dernière).

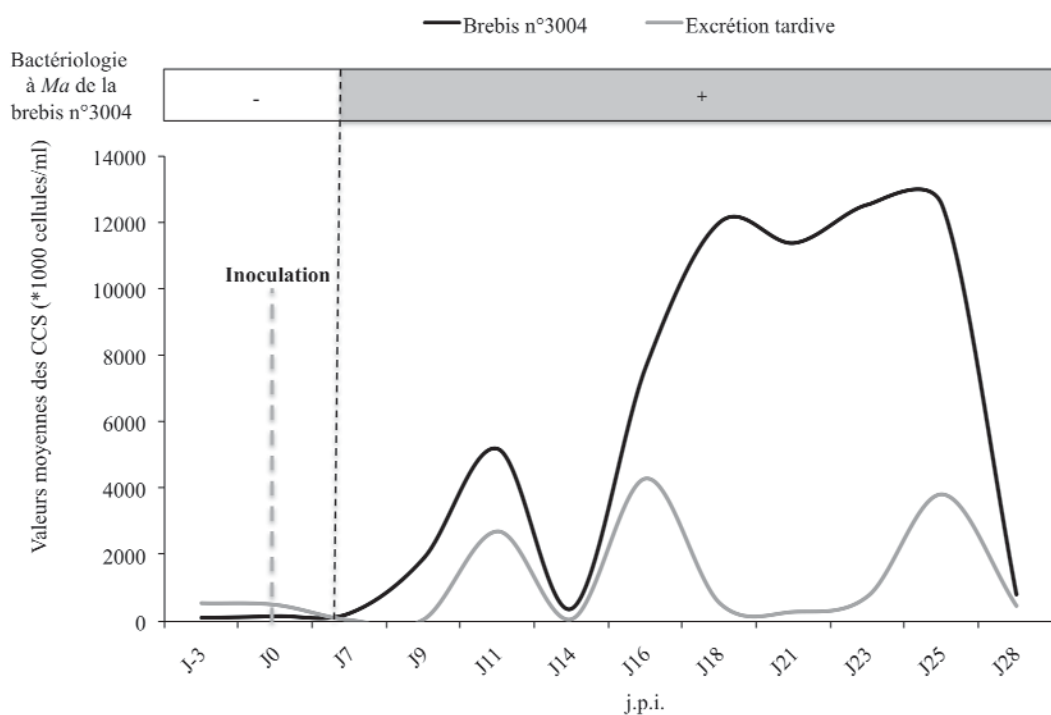


Figure 11 : Comparaison de l'évolution des moyennes arithmétiques des comptages de cellules somatiques (CCS) des brebis à excrétion « tardive » (postérieure à J₁₈) et de la brebis n°3004 (avec la bactériologie de cette dernière).

Dans ces 2 graphiques, les valeurs de comptage cellulaire correspondantes à un isolement bactérien (non mycoplasmique) dans le lait à une date donnée ont été retirées.

On retrouve, sur les différentes courbes, l'évolution en sinusoïde des comptages cellulaires avec 3 pics, tous supérieurs à 300 000 cellules/ml, avec une période allant de 5 à 9 jours.

La brebis n°3044 a présenté le 1^{er} pic de comptage cellulaire à J₉ puis l'excrétion de *Ma* a été mise en évidence à J₁₁. Il s'en suit un pic élevé à J₁₆ puis un dernier pic à J₂₅ nettement inférieur expliqué par l'absence à partir de J₂₁ de valeurs de comptage cellulaire pour l'hémi-mamelle gauche.

Pour la brebis n°3004, le 1^{er} pic intervenait à J₁₁, après le début d'excrétion de *Ma* à J₇. On remarque une forte augmentation des comptages cellulaires à partir de J₁₄ avec 2 pics importants à J₁₈ et J₂₅.

Les brebis à excrétion « tardive » ont présenté un 1^{er} pic à J₁₁ puis à J₁₈ et J₂₃ pour le lot inoculé à 10³ UFC alors que l'excrétion de *Ma* a été détectée à partir de J₂₁ et J₂₃. Le lot inoculé à 10⁵ UFC a présenté 2 autres pics à J₁₆ et J₂₅ pour un début d'excrétion de *Ma* à J₁₈ et J₂₅.

2.4.4 Synthèse

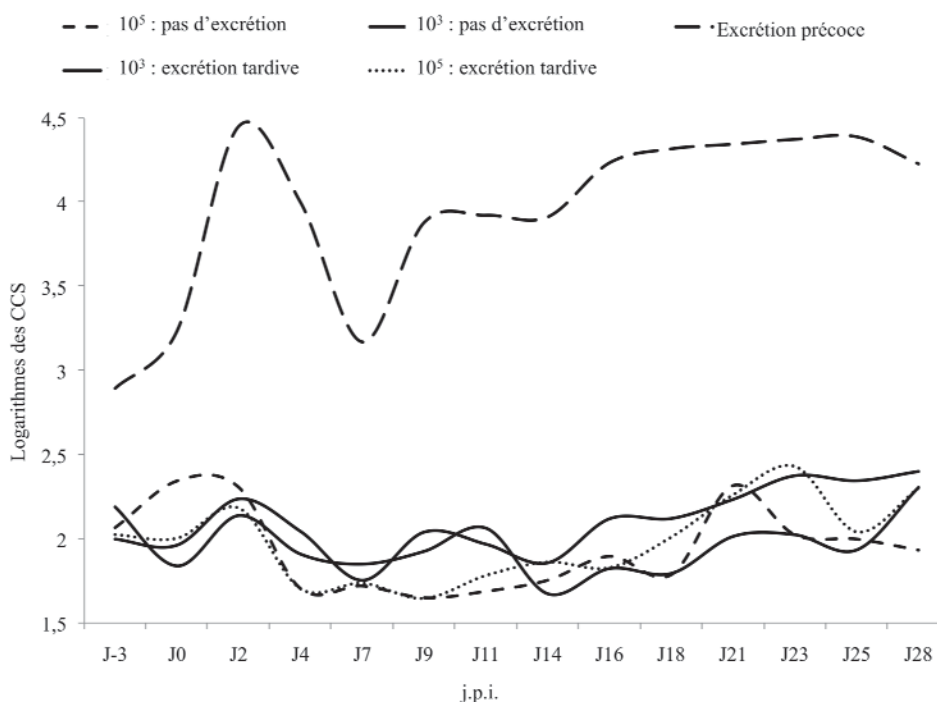


Figure 12 : Evolution des logarithmes de comptages cellulaires (en moyennes géométriques) en fonction du statut excréteur de *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) des lots inoculés (après avoir retiré les infections mammaires non mycoplasmiqes).

La figure n°12 présente les moyennes géométriques des logarithmes de comptages cellulaires en fonction de l'excrétion de *Ma* (sans les brebis témoins). Seules les 2 héli-mamelles ayant excrété précocement et co-infectées, montrent des valeurs supérieures aux autres ($p = 0,006$, différence significative). Les 4 autres catégories (absence d'excrétion ou excrétion « tardive ») présentent des cinétiques du même type (différences non significatives). La pente des courbes des héli-mamelles excrétrices « tardives » inoculées avec 10^3 ou 10^5 UFC est positive, de façon plus ou moins régulière, à partir de J₉ à J₁₄.

Indépendamment des excrétrices « précoces », seules 3 brebis présentent une valeur unique élevée (800 000 cellules/ml et plus) en l'absence d'isolement bactérien autre que mycoplasmique.

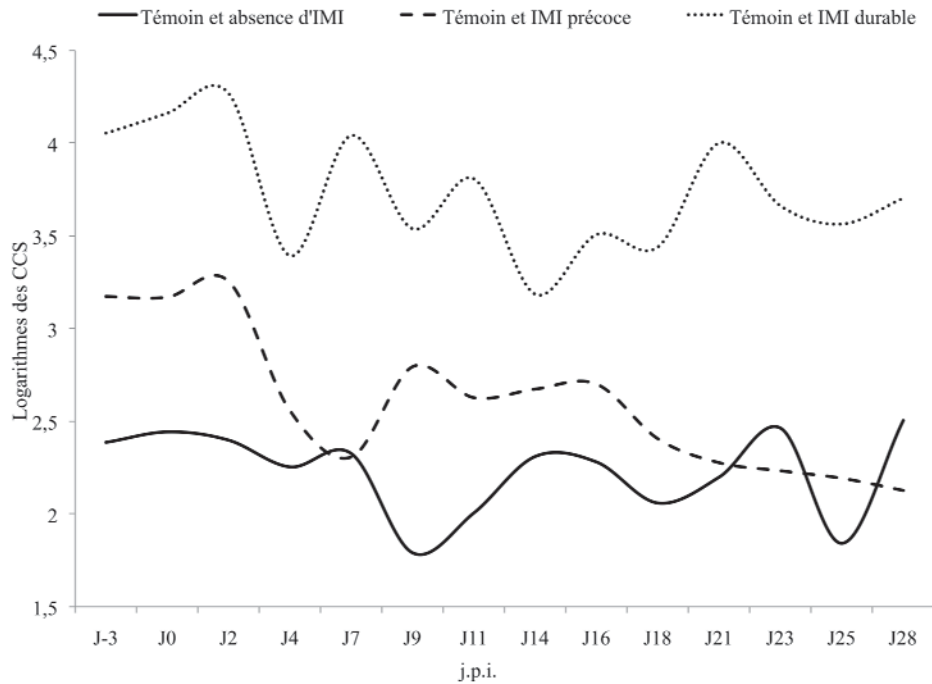


Figure 13 : Evolution des logarithmes de comptages cellulaires (en moyennes géométriques) des brebis du lot témoin en fonction de la présence d'infections intra-mammaires (IMI).

La figure n°13, de même, est relative aux brebis du lot témoin. Les héli-mamelles n'ayant pas présenté d'infection intra-mammaire ont des valeurs comprises entre 1,8 et 2,5 logarithmes de comptages cellulaires, comme celles qui n'ont pas excrété *Ma* dans les lots inoculés (différences non significatives). En revanche, les héli-mamelles infectées par des bactéries « non spécifiques » montrent des valeurs du même ordre que celles qui ont excrété *Ma* (et significativement différentes des précédentes, $p = 0,004$).

2.5 Symptômes mammaires

2.5.1 Inspection des mamelles

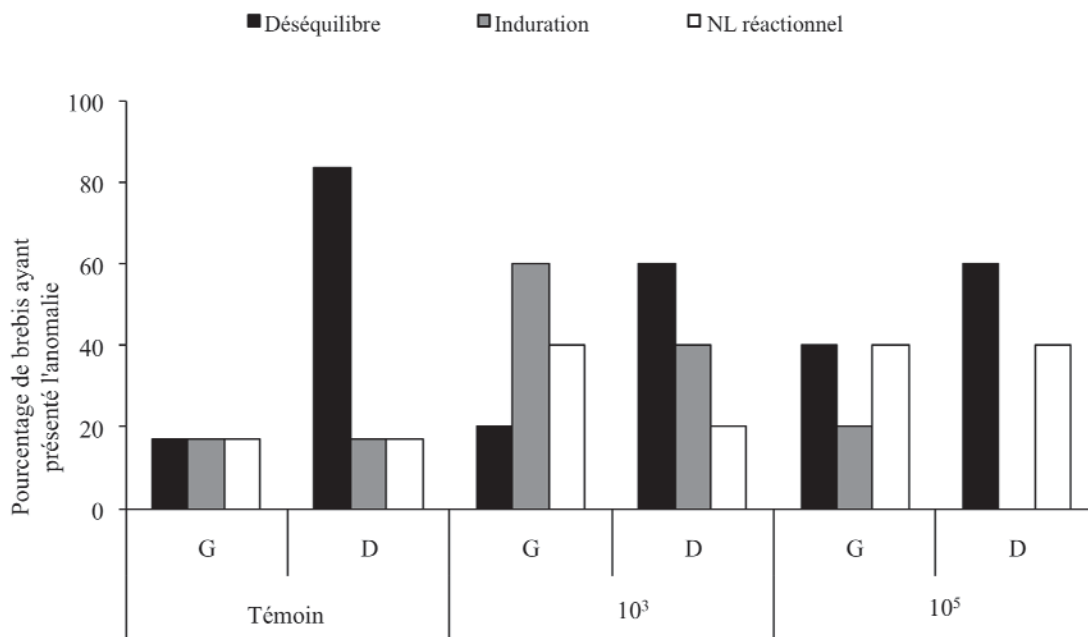


Figure 14 : Répartition des anomalies détectées à l'inspection des mamelles pour les lots témoin et inoculés. (NL : nœud lymphatique)

Sur l'ensemble de l'expérimentation, l'inspection des mamelles a révélé peu d'anomalie.

Les déséquilibres des mamelles sont souvent à droite quelque soit le lot, notamment pour le lot témoin (80% des brebis). Les déséquilibres à droite ont été identifiés chez 60% des brebis de chaque lot inoculé.

2.5.2 Palpations

Les indurations diffuses de la mamelle ont été rarement observées. Le lot inoculé à 10³ UFC, 60% de brebis à gauche et 40% à droite ont présenté cette anomalie.

Comme les indurations et indépendamment du lot, peu de brebis ont présenté des nœuds lymphatiques rétro-mammaires réactionnels. Dans les lots inoculés, seules 40% des brebis ont présenté cette anomalie au cours de l'expérimentation, sauf dans le lot inoculé à 10³ UFC sur l'hémi-mamelle droite (15%).

2.5.3 Scores cliniques

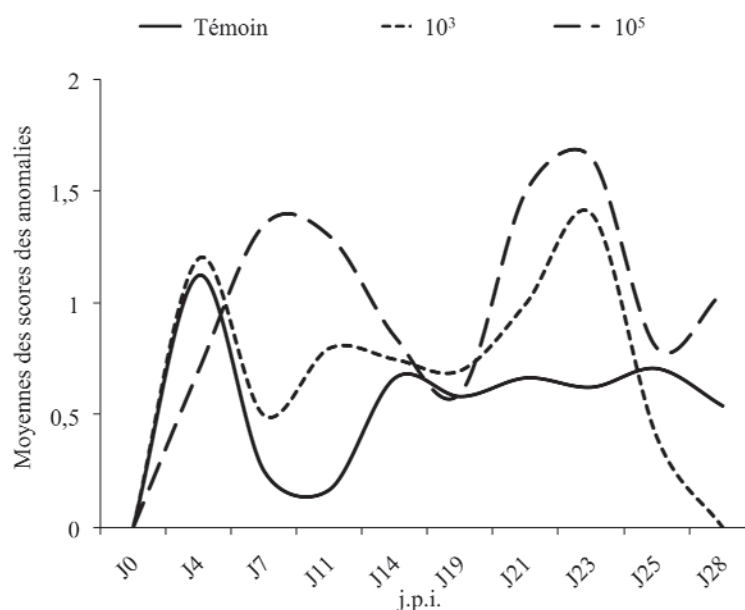


Figure 15 : Evolution des moyennes arithmétiques des scores individuels des anomalies pour les lots témoin et inoculés (abcès exclus).

Les scores individuels ont été définis en ajoutant, à une date donnée, les notes issues de l'inspection ou de la palpation des mamelles sur les critères déséquilibre, d'induration et de réaction des nœuds lymphatiques rétro-mammaires.

Pour les 3 lots, la moyenne des scores a augmenté entre J₀ et J₄ ou J₇. L'augmentation la plus importante concerne le lot inoculé à 10⁵ UFC avec une élévation de 1,4 entre J₀ et J₇.

La courbe du lot témoin présente 2 pics à J₄ (1,1) et J₁₄ (0,6) puis les scores restent stables. On note 3 pics sur la courbe du lot inoculé à 10³ CFU/ml à J₄ (1,2), J₁₁ (0,8) et J₂₃ (1,4) et 2 pics pour le lot inoculé à 10⁵ CFU/ml à J₇ (1,4) et J₂₃ (1,6).

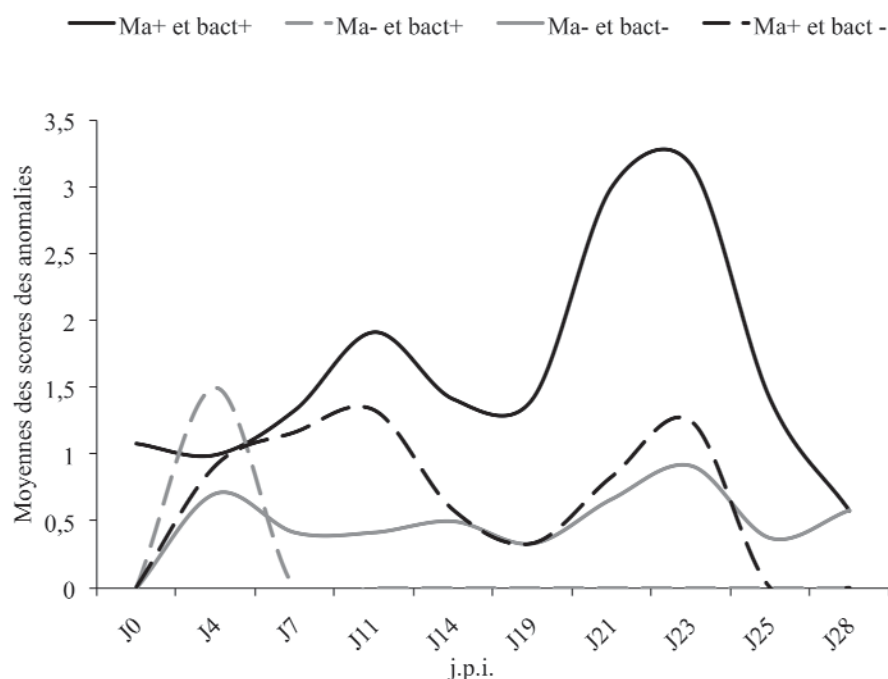


Figure 16 : Evolution des moyennes arithmétiques des scores individuels des anomalies des brebis selon le statut bactériologique et mycoplasmaïque (*Ma*) du lait pour les lots inoculés (abcès inclus). *Ma* + : brebis ayant excrété *Ma* à une moment donné de l'expérimentation ; bact + : brebis ayant excrété des bactéries (autres que mycoplasmes) à une moment donné de l'expérimentation.

La courbe des brebis ayant excrété à la fois *Ma* et d'autres bactéries a les plus hautes moyennes de scores avec 2 pics à J₁₁ (1,9) et J₂₃ (3,2).

La courbe des brebis ayant excrété *Ma* présente, uniquement, 2 pics à J₁₁ (1,3) et J₂₃ (1,3). Entre ces deux pics, les moyennes restent supérieures à 0,3.

Le score des brebis non excrétrices reste inférieur à 0,9.

2.6 Examens et analyses nécropsiques

2.6.1 Examen nécropsique des nœuds lymphatiques

Dans le lot témoin, seule la brebis n°3024 a été autopsiée et présentait des lésions hémorragiques sur le NII rétro-mammaire gauche et le NII iliaque gauche.

Les autopsies des brebis du lot inoculé à 10³ UFC ont révélé des modifications des nœuds lymphatiques (NII) :

- NII rétro-mammaires réactionnels hémorragiques chez toutes les brebis (sauf la brebis n°1037), concernant aussi bien l'hémi-mamelle gauche que la droite

- Nll iliaques (mêmes anomalies) chez toutes les brebis mais davantage à gauche
- Nll pré-scapulaires et mésentériques hémorragiques (60%)

Pour le lot inoculé à 10^5 UFC, les lésions observées ont concerné :

- Nll rétro-mammaires (droit et gauche) et pré-scapulaires hémorragiques chez 40 % des brebis
- Nll iliaques hémorragiques chez toutes les brebis, avec une atteinte plus importante à droite
- Nll parotidiens (droit et gauche) hémorragiques

L'intensité des lésions observées a été modérée, hormis pour les Nll iliaques. Aucune anomalie sur les Nll n'a été mise en évidence chez les trois agneaux autopsiés : 2 étaient issus de la brebis n°3044 du lot inoculé à 10^3 UFC et 1 de la brebis n°3004 du lot inoculé à 10^5 UFC.

2.6.2 Recherche de *Mycoplasma agalactiae* dans les nœuds lymphatiques (Nll) (cf. annexe 3)

Pour le lot témoin, toutes les PCR sur nœuds lymphatiques ont été négatives chez la brebis n°3024.

Pour le lot inoculé à 10^3 UFC, toutes les brebis ayant excrété *Ma* dans le lait ont présenté des PCR positives (sauf la brebis n°1059). Les PCR positives ont concerné les Nll rétro-mammaires droits et gauches et pré-scapulaires gauches, de manière variable selon les brebis. Les brebis n°3044 et n°2015, dont les excrétions de *Ma* dans le lait ont été bilatérales, ont présenté des PCR positives sur les 2 Nll rétro-mammaires (ainsi que sur le pré-scapulaire gauche pour la seconde).

De même, toutes les brebis du lot inoculé à 10^5 UFC ayant excrété *Ma* dans le lait ont présenté des PCR positives (sauf la brebis n°1067). Les Nll rétro-mammaires, pré-scapulaires, iliaques et axillaires gauches ont présenté des PCR positives : chez 2 brebis pour le rétro-mammaire gauche (n°3065 et 3004) et le pré-scapulaire gauche (n°2023 et 3012). Aucune PCR n'a été positive sur les Nll du côté droit, bien qu'un isolement de *Ma* dans l'hémi-mamelle droite de la brebis n°3004 ait été mis en évidence.

3 Discussion

3.1 Discussion du matériel et des méthodes

Une recherche visant à l'exhaustivité des publications disponibles sur les modèles expérimentaux d'agalactie contagieuse ovine a été réalisée à l'aide de Pubmed, Science Direct et Ovid. Les articles utilisables sont présentés au tableau n°5.

Tableau 5 : Travaux de reproduction expérimentale de l'infection à *Mycoplasma agalactiae* dans la littérature.

Age, sexe	Stade physiologique	Voie	Titre	Auteurs
Brebis adultes	En lactation	SCut.	10 ⁸	Bergonier <i>et al.</i> , 1997
			10 ⁸	Galisson, 2001
		Imam.	10 ⁸	Galisson, 2001
			10 ⁸	Sanchis <i>et al.</i> , 1999
		Conj.	10 ⁹	Buonavoglia <i>et al.</i> , 1999
		INasale	10 ⁹	Buonavoglia <i>et al.</i> , 1999
Agneaux, 6 mois	Castré ou non	Conj.	10 ⁵ -10 ⁹	Sanchis <i>et al.</i> , 1998
		Diverses	10 ⁸	Mac Owan <i>et al.</i> , 1984
Béliers adultes	Maturité sexuelle	SCut.	10 ⁶	Or <i>et al.</i> , 2005

SCut. : sous-cutanée ; Imam. : intra-mammaire ; Conj. : conjonctivale ; INasale : intra-nasale

3.1.1 Sélection et caractéristiques des brebis

- Race :

Les brebis utilisées dans cette étude sont de race Lacaune mixte (laitière et allaitante) dénommée Lacaune viande par les professionnels. Elles sont issues d'un élevage aveyronnais (zone indemne d'agalactie contagieuse). L'intérêt était d'avoir une race fortement laitière, afin d'espérer des signes cliniques mammaires plus marqués et/ou plus faciles à quantifier dans un cadre comparatif éventuel (comparaison de diverses souches, ...). D'autre part, cette race, dans le schéma viande, a une prolificité relativement élevée (160 à 200%), ce qui permet des effectifs d'agneaux suffisants pour mettre en évidence d'éventuels symptômes lors de contamination par contact ou par la tétée (dans notre expérimentation, avec 16 brebis il a eu 22 agneaux).

En effet, l'intérêt des agneaux sous la mère est d'étudier l'infection naturelle dans un cadre contrôlé.

- Stade physiologique :

Globalement, toutes les brebis ont été inoculées un mois après la mise-bas, donc en début de lactation et autour du pic de lactation. La justification, ici, est double. D'une part, pour mesurer la production laitière, il était nécessaire de séparer les agneaux la veille, ce qui impliquait qu'ils aient plus de deux ou trois semaines (âge à partir duquel ils commencent à consommer des concentrés). D'autre part, les mises-bas s'étant échelonnées sur 1 mois environ, il fallut attendre que l'effectif expérimental soit suffisant (les brebis n°2049 et 2010 ont mis-bas à J₋₂ et J₅, puis ont été introduites dans le lot témoin à J₁₁ et J₂₁ respectivement).

De plus, HASSO *et al.* (1993) a montré, dans son étude clinique sur des chèvres, l'importance du stade physiologique pour l'expression clinique de l'infection à *Ma*. En effet, les stades les plus sensibles pour le développement de l'agalactie contagieuse à *Ma* sont la gestation, la mise-bas et le début de la lactation (MACOWAN *et al.*, 1984). Les modifications hormonales (la progestérone ayant des propriétés immunosuppressives) induites par ces stades facilitent la multiplication de *Ma* dans l'organisme et favorisent l'apparition d'une forme clinique de l'agalactie contagieuse.

Une inoculation plus précoce aurait permis de s'affranchir de la chute physiologique de la production laitière postérieure au pic de lactation survenant approximativement à un mois. Dans notre étude, l'inoculation se situe peu de temps après le pic de lactation alors que la chute de production est encore faible ce qui influencera peu nos résultats.

Les brebis de cette étude sont principalement des animaux ayant déjà eu au moins deux lactations. Dans notre expérimentation où l'on étudie une affection ayant un tropisme mammaire, l'utilisation de primipares aurait permis d'avoir l'assurance que les mamelles soient préalablement saines.

L'utilisation d'animaux jeunes est souvent retrouvée dans les publications, notamment SANCHIS *et al.* (1998) avec des agneaux et agnelles de 5 à 7 mois, ou BUONAVOGLIA *et al.* (1999) avec des brebis de 8 mois d'âge. Néanmoins, l'objectif de notre travail était de valider un protocole de reproduction de l'agalactie contagieuse. *Ma* ayant un tropisme principal pour la mamelle, l'utilisation de brebis en lactation semblait plus pertinente, d'autant plus que l'on pouvait profiter, également, de la contamination indirecte des agneaux par contact ou tétée.

- Sélection des animaux et critères d'exclusion :

Tout d'abord, ce sont sur des critères de négativité clinique et bactériologique vis-à-vis de *Ma*, qu'ont été sélectionnées les brebis de cette expérimentation. De plus, celles-ci provenaient d'une zone géographique indemne d'agalactie contagieuse. Une vérification du statut sérologique vis-à-vis de *Ma* a été réalisée avant l'inoculation, ainsi qu'une vérification d'absence d'infection à *Ma* par écouvillonnages auriculaires et respiratoires.

En parallèle, une évaluation du statut sanitaire des mamelles vis-à-vis d'autres mycoplasmes et des bactéries a été réalisée à J₋₁₀ et J₀, révélant la présence de pathogènes (staphylocoques à coagulase négative, *E. coli*) dans la mamelle de 6 brebis ce qui risque d'influencer les résultats post-inoculation. Une brebis présentant dès la mise-bas une mammite clinique, a été exclue.

- Effectifs des lots :

Dans notre étude expérimentale, 16 brebis ont été réparties en trois lots : 6 dans le lot témoin et 5 dans chaque lot inoculé. Dans la bibliographie, les effectifs utilisés sont souvent inférieurs au nôtre. En effet, l'étude de BUONAVOGLIA *et al.* (1999) comptait 6 brebis, celle de MACOWAN *et al.* (1984) portait sur 9 agneaux et le travail de OR *et al.* (2005) a été réalisé sur 15 béliers. L'étude de SANCHIS *et al.* (1999) comptait 29 brebis au total réparties en 6 groupes de 5 (dont un de 4).

3.1.2 Conduite zootechnique et expérimentale

Les lots inoculés et témoin étaient conduits dans deux bâtiments différents. Ainsi, pour éviter tout risque de contamination croisée, les jours de prélèvements ou de séparation des agneaux, le lot témoin était traité en premier. Ensuite, les lots inoculés étant séparés en 2 boxes, le lot à 10³ UFC était traité avant le lot 10⁵ UFC. En parallèle, un respect rigoureux des règles d'hygiène et de biosécurité entre le lot sain et les lots inoculés a été adopté : port de bottes, blouses, gants et lavage des mains, propre à chaque lot. Lors des séparations mères-agneaux, ces derniers étaient séparés dans deux enclos distincts. La non contamination des animaux témoins a pu être vérifiée par sérologie ELISA, ainsi que par analyses bactériologiques sur le lait pendant et après l'expérimentation. Cependant, ces conditions de conduite semblent être celles qui se rapprochent le plus des conditions d'élevage naturelles. De plus, aucune

publication ne rapporte l'intérêt d'une conduite en boxes individuels dans le cadre de reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse.

- Surveillance clinique et mesures :

Pour les mesures de production laitière, une séparation des agneaux a été effectuée la veille puis, après une vidange complète des deux hémimamelles, les mesures de production ont été réalisées le matin (approximativement 15 heures après). En l'absence de salle de traite, la vidange des mamelles a été manuelle, ce qui peut constituer un biais pour les mesures de production. Les protocoles des précédents travaux incluaient l'utilisation d'une machine à traire (thèse de doctorat vétérinaire de GALISSON, 2001, et DUQUESNOY, 2000) et avaient montré une bonne répétabilité des mesures de production. Cependant, la vidange manuelle étant réalisée par du personnel expérimenté, on peut considérer que celle-ci était relativement complète.

Les inspections des mamelles ont toujours été réalisées par le même opérateur, puisque certains critères d'évaluation ne sont pas dénués d'éventuels effets opérateurs. Pour la même raison, les inspections cliniques (boiterie, kérato-conjonctivite) des mères et agneaux ont été réalisées par 2 vétérinaires (Dr. BERGONIER, Mlle BRESSOLIN).

En ce qui concerne les autres prélèvements ou inspections et la contention des animaux, une équipe d'opérateurs a été nécessaire.

La périodicité des prélèvements, au cours de l'expérimentation, a permis de recueillir un nombre satisfaisant de données à interpréter : 2 mesures de production laitière par semaine, 3 prélèvements sanguins et de lait par semaine, et un suivi de température 5 fois par semaine. Pour compléter notre étude et aider à mieux interpréter les résultats, il aurait pu être réalisé davantage de mesures (production, température...) avant inoculation, comme cela a été effectué dans une étude précédente (thèse de doctorat vétérinaire de GALISSON, 2001), avec notamment 5 mesures de production laitière avant inoculation (de J₋₃₃ à J₀). Cependant, de par la quantité de travail que cela supposait sur des laitières comme les Lacaunes et de par l'étalement des mises-bas sur un mois, seules des mesures à J₀ ont été réalisées (à J₋₃ pour les comptages cellulaires, J₋₁₀ pour la bactériologie classique).

- Durée de l'expérimentation :

L'excrétion de *Ma* dans le lait ayant été majoritairement tardive dans notre étude, un suivi plus long aurait été préférable (au moins 2-3 semaines supplémentaires au minimum). De

plus, de légères chutes de production laitière ont été enregistrées lors des dernières mesures à J₂₁. Un suivi plus long aurait permis d'étudier la persistance de l'excrétion et la suite des courbes de production laitière.

3.1.3 Protocole d'inoculation

- Choix de la souche de *Ma* :

La souche utilisée est la souche de référence PG₂ de *Ma*. Dans notre expérimentation, la souche PG₂ a été choisie pour tenter de se donner une référence internationale à partir de la seule souche connue de tous les laboratoires. En effet, elle est bien connue et régulièrement utilisée en laboratoire pour les études sur l'agalactie contagieuse. Le pouvoir pathogène de PG₂ est considéré comme modéré à très modéré en reproduction expérimentale (BERGONIER *et al.*, 1997). La majorité des auteurs utilise des souches locales (BUONAVOGLIA *et al.*, 1999, SANCHIS *et al.*, 1998 et 1999, BERGONIER *et al.*, 1997, OR *et al.*, 2005, GALISSON, 2001). Dans l'étude de MACOWAN *et al.* (1984) afin d'étudier la représentativité de leurs souches sauvages V8 et Annecy, les caractéristiques antigéniques ont été comparées à celles de la souche PG₂.

- Préparation des inocula :

Après avoir déterminé avec précision la concentration des inocula, c'est-à-dire 10³ et 10⁵ UFC, ceux-ci ont été congelés à -80°C afin de stopper la multiplication bactérienne tout en conservant la viabilité des cellules bactériennes (celle-ci a été vérifiée). Le jour de l'inoculation, les inocula sont passés d'une température négative à des températures corporelles avoisinant les 39°C. Il convient peut-être de considérer qu'un tel choc thermique a pu retarder la reprise de la multiplication bactérienne au site d'injection et, ainsi, retarder la colonisation. En effet, cette latence peut laisser le temps à l'immunité locale innée, non spécifique, d'éliminer ou de freiner une partie des mycoplasmes inoculés. La question de la priorité à donner à la rigueur de la détermination de la concentration et à sa répétabilité ou à la nécessité de gagner en efficacité de la colonisation ou de la virulence pourrait être posée. L'alternative, souvent utilisée au laboratoire de l'ENVIT (BERGONIER *et al.*, 1997), consiste à partir d'une culture-mère de titre parfaitement connu, à la relancer en culture selon un protocole standardisé donnant une cinétique de croissance pré-établie, à vérifier la concentration approximative par mesure de densité optique, et à réaliser les dilutions adéquates pour obtenir le titre souhaité de façon approximative. Le titre précis n'est, dans ce

cas, connu qu'après les inoculations, mais à aucun moment les bactéries inoculées ne subissent de congélation après la relance de la culture. La seconde possibilité consiste à rester sur la procédure utilisée ici, mais à passer de -80°C à +39°C par 1 ou 2 paliers progressifs (-20°C, +4°C), de façon plus douce. Certains auteurs proposent de rapprocher le milieu de culture des caractéristiques des fluides biologiques visés, par exemple par un repiquage dans du lait (SANCHIS *et al.*, 1999). Le choix doit être réalisé, pour chaque espèce bactérienne, en fonction de l'objectif spécifique de l'expérimentation.

- Titre des inocula :

Dans notre étude, il a été choisi de travailler avec des titres d'inoculum moyens : 10^3 et 10^5 UFC, afin d'évaluer la virulence de la souche utilisée dans des conditions se rapprochant, au plan quantitatif, de l'infection naturelle. La répartition en deux lots inoculés avec des titres différents permettait d'évaluer un effet concentration de l'inoculum. La plupart des études expérimentales rapportent l'utilisation de titres d'inoculum élevés (cf. tableau 5). Déjà dans l'étude de MACOWAN *et al.* (1984), les agneaux castrés étaient inoculés à 10^8 UFC. Puis BUONAVOGLIA *et al.* (1999) inocule ses brebis à 10^9 UFC. Seule l'étude de SANCHIS *et al.* (1998) répartit les agneaux et agnelles en groupes avec des titres d'inoculation différents, allant de 10^5 à 10^9 UFC. Il a ainsi montré que l'inoculation à 10^7 et plus UFC (par la voie conjonctivale) permettait d'obtenir une reproduction expérimentale de l'infection, mais pas des symptômes de l'agalactie contagieuse. En revanche, ces auteurs abandonnent le titre de 10^5 UFC car il ne permet l'obtention que de 2 cultures d'écouvillons positives sur 48, contre respectivement 29 et 22 sur 48 avec 10^7 et 10^9 UFC.

Dans l'optique de mettre en évidence un éventuel effet titre sur l'intensité des symptômes, il aurait été intéressant d'ajouter un lot inoculé à 10^7 UFC à notre étude. Le titre de 10^3 UFC n'a jamais été utilisé dans la littérature accessible.

- Voie d'inoculation :

Le choix de la voie sous-cutanée se justifie tout d'abord par, sa simplicité de réalisation, contrairement aux voies intra-mammaire ou oculaire, plus délicates. De plus, pour cette dernière, le simple dépôt d'une goutte de culture sur la conjonctive ne permet pas d'être certain du volume inoculant réel, ni de limiter le risque de transmission aux congénères dès le début de l'essai (SANCHIS *et al.*, 1998).

Il est vrai que, *Ma* ayant un tropisme majeur pour la mamelle, la voie intra-mammaire est appropriée pour l'agalactie. Cependant, dans notre étude expérimentale, nous souhaitons aussi mettre en évidence d'autres symptômes que les modifications mammaires, comme les arthrites ou les kérato-conjonctivites. Nous souhaitons reproduire la colonisation de l'organisme et l'isolement de l'agent causal par une autre voie d'excrétion que celle utilisée par l'inoculation (mise en évidence d'une colonisation sanguine et/ou lymphatique).

Très peu d'auteurs ont comparé différentes voies d'inoculation et ne rapportent pas de différences significatives entre la voie sous-cutanée et la voie intra-mammaire. L'étude de HASSO *et al.* (1993) s'est intéressée à la sévérité des symptômes de l'agalactie contagieuse sur des chèvres selon la voie d'inoculation de *Ma*. Le groupe inoculé par voie sous-cutanée a présenté les signes cliniques les plus importants, suivi par le groupe intra-mammaire.

D'autres auteurs utilisent diverses voies pour comparer la virulence de la souche de *Ma* inoculée ; ainsi MACOWAN *et al.* (1984) a employé les voies intra-trachéale, intra-nasale ayant provoqué une bactériémie à J₃ pour les animaux inoculés, et la contamination de contact (bactériémie à J₂₂). L'étude de SANCHIS *et al.* (1998) utilisait la voie conjonctivale tout comme BUONAVOGLIA *et al.* (1999).

Les brebis du lot témoin ont reçu un bouillon stérile par voie sous-cutanée pour s'affranchir d'un éventuel facteur « stress » lié à l'acte d'inoculation.

3.2 Discussion des résultats

3.2.1 Bactériologies classique et mycoplasmique

Au cours de notre étude, il a été isolé dans le lait, chez 2 brebis de chaque lot inoculé et 3 du lot témoin, des pathogènes mineurs (staphylocoques coagulase négative) et, pour une brebis du lot inoculé à 10³ UFC et une du lot témoin, des *E. coli* n'ayant produit que des mammites subcliniques. Ces infections (lot témoin) ou co-infections (lots inoculés) mammaires constituent un défaut pour notre expérimentation, car elles gênent respectivement, la comparaison à des contrôles négatifs et la caractérisation fine d'effets. Cependant, les 2 brebis excrétrices précoces et durables étant dans ce cas, nous pouvons nous demander si ces co-infections ne nous ont pas permis de proposer l'hypothèse suivante : une infection intra-mammaire pré-existante à l'inoculation pourrait favoriser l'établissement d'une infection mycoplasmique locale du fait de l'augmentation de la filtration et de la diapédèse hémato-alvéolaire (voire lymphatique). Notons, tout de même, que d'autres facteurs peuvent être à l'origine de cette classique variabilité inter-individuelle : affections intercurrentes, carences

oligo-vitaminiques, ... (OR *et al.*, 2005). Rappelons que toutes les brebis étaient séronégatives vis-à-vis de la border disease.

En ce qui concerne la recherche de mycoplasmes dans le lait, l'étude a montré 9 brebis sur 10 ont excrété *Ma* dans le lait. Dans chaque lot inoculé, une brebis a excrété plus précocement (J₇ et J₁₁) que les autres avec une persistance de l'excrétion jusqu'à la fin de l'expérimentation. On notera que c'est la brebis du lot inoculé à 10⁵ UFC qui est la première à excréter. Cependant, si l'on se réfère au travail de WATSON *et al.* (1968) où l'excrétion apparaît à J₅, l'excrétion de ces 2 brebis dans le lait est tardive. De même, l'inoculation sous-cutanée de brebis en lactation avec 10⁸ UFC induit un début d'excrétion compris entre J₃ et J₇ (BERGONIER *et al.*, 1997, BERGONIER, 1992). Puis ce n'est qu'à partir de J₂₁ pour le lot inoculé à 10³ UFC et J₁₈ pour le lot inoculé à 10⁵ UFC, que les autres brebis commencent à excréter *Ma* dans le lait. Ce temps de latence, entre l'inoculation et l'excrétion mammaire, peut être expliqué, d'une part, par une mise en place ralentie de la bactériémie et/ou une colonisation mammaire plus lente à partir du compartiment sanguin. En effet, comme il a été signalé dans le paragraphe sur l'inoculation (protocole d'inoculation : préparation des inocula), le choc thermique lors de l'inoculation entre les températures négatives et 39°C a pu ralentir la reprise de multiplication des mycoplasmes, et ainsi permettre à l'immunité non spécifique locale (nœud lymphatique pré-scapulaire) d'éliminer une partie des mycoplasmes inoculés (brebis n°2006 et 2023 n'ayant jamais excrétées). D'autre part, ce profil d'excrétion peut tout simplement être lié au titre des inoculations, faibles à très faibles par rapport à la littérature. L'intervention de la contamination des brebis à excrétion tardive par contact avec celle à excrétion précoce est envisageable. En effet, dans son étude, MACOWAN *et al.* (1984) montre une contamination du lot de contact par les agneaux inoculés. Dans notre cas, une contamination directe par l'environnement ou les sécrétions oculaires et nasales est envisageable, tout comme une contamination indirecte par les agneaux voleurs de lait.

3.2.2 Symptômes cliniques

Durant l'étude clinique, l'infection à *Ma* a été inapparente : il n'y a pas eu de pic de température et, bien que quelques brebis aient présenté des températures supérieures à 39,5°C, cela restait ponctuel (et concernait aussi le lot témoin, infecté par des germes non mycoplasmiques). Cela peut être attribué au stress dû à la manipulation des animaux. MACOWAN *et al.* (1984), OR *et al.* (2005) et SANCHIS *et al.* (1998) ne parviennent pas à mettre en évidence de pic d'hyperthermie chez leurs animaux inoculés.

D'autre part, peu de modifications mammaires (induration, déséquilibre, réaction des nœuds lymphatiques) ont été observés. Les déséquilibres concernaient surtout l'hémi-mamelle droite quelque soit le lot, alors que 6 brebis sur 9 ont excrété *Ma* à gauche (et 5 sur 9 à droite). Néanmoins, les brebis n°3044 (10^3 UFC), n°3004 (10^5 UFC) ont présenté des déséquilibres à gauche en relation avec l'excrétion de *Ma* à gauche. Hormis pour ces dernières, il apparaît difficile d'attribuer les déséquilibres mammaires uniquement à l'infection par *Ma*. Cependant, l'induration de l'hémi-mamelle gauche prédomine par rapport à l'hémi-mamelle droite dans les lots inoculés. De même, pour le lot inoculé à 10^3 UFC, les nœuds lymphatiques réactionnels concernaient l'hémi-mamelle gauche (40% des brebis contre 20% à droite) et pour le lot inoculé à 10^5 UFC, aucun côté ne prédominait. En résumé, même si l'infection par *Ma* peut être responsable de certaines modifications mammaires observées, celles-ci restent de sévérité faible tout au long de l'expérimentation (pas de signe aigu). De plus, certaines brebis ont présenté des isolements bactériens en parallèle pouvant biaiser ces résultats. En effet, dans les lots inoculés, les scores les plus élevés ont été obtenus chez les brebis ayant présenté des co-infections bactériennes au cours de l'expérimentation. Même si l'infection à *Ma* n'est pas responsable, à elle seule, chez toutes les brebis, des modifications observées, elle a induit des symptômes mammaires persistants bien que faibles. Il apparaît, également, que la présence d'une co-infection bactérienne augmentent l'importance des symptômes mammaires. Le lot témoin a présenté 80% de brebis avec un déséquilibre, ce qui s'explique par la présence de mammites subcliniques bactériennes.

3.2.3 Symptômes mammaires fonctionnels

- Production laitière :

La courbe de production laitière du lot témoin montre une augmentation de production due à l'introduction, à J₁₁ et à J₂₁, de nouvelles brebis en début de lactation masquant la diminution progressive physiologique. Cependant une chute transitoire est observée à J₇ pouvant être le reflet de la baisse de production physiologique et des modifications mammaires causées par les infections bactériennes.

Les brebis à excrétion « précoce » (n°3044 et 3004) des lots inoculés suivent le même schéma d'évolution de production laitière, avec une chute brutale de production à partir de J₄ (J₇ pour la n°3004) qui se poursuit progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation. Il convient de noter que, chez les brebis n°3044 et 3004, les chutes de production laitière les plus marquées

sont observées sur l'hémi-mamelle gauche. L'agalactie chez ces 2 brebis est presque totale pour cette hémi-mamelle en fin d'expérimentation. Cependant, ces chutes ne peuvent être totalement attribuées à l'infection par *Ma* puisque ces 2 brebis présentaient à J₄ et J₇ des isolements bactériens dans le lait. De plus, en comparaison avec l'étude réalisée par GALISSON (thèse de doctorat vétérinaire, 2001) où la chute de production intervient entre J₅ et J₇ pour le lot inoculé en sous-cutané, les chutes observées, dans notre étude, chez les 2 brebis à excrétion « précoce », sont moins importantes.

Pour les brebis à excrétion « tardive », une première chute de production plutôt faible est mise en évidence à J₄ puis une deuxième chute plus marquée à J₁₁. Ces diminutions n'ont pas été significativement différentes des évolutions de production laitière des brebis non excrétrices de *Ma*. Cependant, la première chute pourrait être le reflet des co-infections mammaires bactériennes uniquement (tout comme la 2^{ème} diminution) mais aussi pourrait être lié à un facteur « stress » induit par l'inoculation comme décrit dans l'étude de GALISSON (thèse de doctorat vétérinaire, 2001).

- Comptages cellulaires :

Pour les 3 lots, une évolution sinusoïdale des comptages cellulaires a été mise en évidence tout au long de l'expérimentation. Pour le lot témoin, les comptages cellulaires sont très élevés et à chaque pic, au moins 50% des brebis présentent des comptages cellulaires supérieurs à 300 000 cellules/ml en corrélation avec la présence d'une infection mammaire bactérienne.

Pour les lots inoculés, seul un pic marqué des comptages cellulaires (supérieur à 300 000 cellules/ml) est observé au cours de l'expérimentation (à J₂₁, lot 10⁵ UFC). En effet, seules les brebis n°3044 et 3004, excrétrices « précoces », sont responsables de l'élévation des comptages cellulaires de leur lot respectif. Cependant, ces dernières ont présenté des isolements bactériens fréquents dans le lait tout au long de l'expérimentation. Pour les brebis à excrétion « tardive », les augmentations des comptages cellulaires sont corrélés aux chutes de productions lactières ainsi qu'au début d'excrétion de *Ma*.

On notera que les augmentations des comptages cellulaires les plus importantes sont observées chez les brebis excrétaient *Ma* sur l'hémi-mamelle gauche (brebis excrétaient *Ma* sur l'hémi-mamelle droite : pics inférieurs à 400 000 cellules/ml) et chez les brebis à excrétion « précoce » (et présentant une co-infection mammaire bactérienne). Il semble y avoir une corrélation entre le début d'excrétion mammaire de *Ma* et l'augmentation des comptages

cellulaires pour les lots inoculés. En effet, les comptages cellulaires sont, dans la pratique courante vétérinaire, un indicateur de la santé de la mamelle et reste le seul pour le diagnostic des mammites subcliniques (BERGONIER *et al.*, 2003). Néanmoins, dans notre étude, il apparaît que le comptage cellulaire ne soit pas un paramètre valable pour l'évaluation de l'infection mammaire par *Ma*. En effet, l'évolution des comptages cellulaires des brebis à excrétion « tardive » n'a pas été significativement différente de celle des brebis n'ayant pas excrété *Ma*. De même, l'évolution des comptages cellulaires des brebis excrétrices de *Ma* n'a pas été significativement différente de celle des brebis du lot témoin présentant une infection mammaire bactérienne.

En conclusion, il apparaît que l'hémi-mamelle la plus touchée (précocité, fréquence, intensité) est la gauche. Les excrétions de *Ma* sur l'hémi-mamelle droite sont plus tardives et induisent des modifications moins marquées (chute de production, augmentation des comptages cellulaires). L'une des hypothèses explicative pourrait être la présence d'une contamination indirecte de l'hémi-mamelle gauche vers la droite par l'intermédiaire des agneaux et, pour les brebis n'excrétant que d'un côté, d'une contamination par les agneaux voleurs de lait (mères avec atteintes bilatérales produisent moins de lait). On notera que la plupart des signes, même s'ils sont faibles et concernent peu de brebis, apparaissent entre J₄ et J₁₁.

Aucune agalactie totale n'a été observée au cours de l'expérimentation ; seules quelques brebis ont présenté une hypogalactie. Les brebis n°3044 et n°3004 ont vu leurs productions de l'hémi-mamelle gauche chuter jusqu'à 75 et 155 ml respectivement à J₂₁. L'étude de BUONAVOGLIA *et al.* (1999) rapporte une agalactie sur toutes les brebis inoculées à partir de J₂₁ et J₂₂. De plus, dans notre essai, aucun effet titre de l'inoculum n'a été mis en évidence même si le lot inoculé à 10⁵ UFC a été le premier à excréter *Ma* (J₇, J₁₁ pour le lot à 10³ UFC).

3.2.4 Résultats nécropsiques

- Examen nécropsique des nœuds lymphatiques (Nll)

Dans le lot témoin, seule la brebis n°3024 a été autopsiée. Les lésions des nœuds lymphatiques observés peuvent être expliquées par la présence d'une infection mammaire bactérienne à J₀ (déséquilibre mammaire modéré à droite de J₄ à J₂₅).

Pour les lots inoculés, il n'a pas été montré d'atteinte généralisée des Nll. Il apparaît que les Nll rétro-mammaires sont les plus touchés lésionnellement (importance des lésions et

fréquence), suivis par les iliaques (lésions importantes mais moins fréquent) en accord avec une atteinte mammaire majeure. En effet, les Nll iliaques et rétro-mammaires drainent la mamelle et sont les lieux de développement de la réponse immunitaire face à l'infection par *Ma*. De même, chez plusieurs brebis, les Nll pré-scapulaires étaient modifiés (hémorragies...), en relation avec le lieu d'inoculation. En résumé, les lésions retrouvées sur les Nll des brebis des lots inoculés sont les témoins de la colonisation et/ou la dissémination de *Ma* depuis le site d'inoculation (épaule gauche) jusqu'à la mamelle.

Les lésions étaient de nature hémorragique essentiellement, mais des infiltrations cellulaires ont été mises en évidence sur quelques Nll. Il n'a pas été montré de latéralisation lésionnelle préférentielle, même si les nœuds lymphatiques du côté gauche semblent être plus fréquemment touchés.

Les agneaux autopsiés n'ont présenté aucune lésion, mais la présence d'une infection par *Ma* ne peut être exclue.

- Recherche de *Mycoplasma agalactiae* dans les nœuds lymphatiques (Nll)

Dans le lot témoin, la négativité des PCR effectuées sur les Nll a confirmé l'absence d'infection par *Ma*.

Pour les lots inoculés, toutes les brebis ayant excrété *Ma* dans le lait ont présenté des PCR positives, sauf pour la brebis n°1059 et n°1067. On notera que ces dernières n'ont présenté qu'un isolement ponctuel de *Ma* dans le lait à J₂₁ et J₁₈ respectivement. Les Nll rétro-mammaires ou pré-scapulaires gauches sont toujours concernés, en accord avec la voie d'inoculation en avant de l'épaule gauche et avec l'excrétion mammaire de *Ma*. Les PCR positives sur les Nll rétro-mammaires ont concerné les brebis ayant eu plusieurs isollements de *Ma* dans le lait (brebis n°3044, 2015 et 3004) et le plus de modifications fonctionnelles mammaires (brebis n°3044 et 3004). Il y a donc bien eu, chez ces brebis, multiplication puis dissémination de l'agent inoculé depuis le site d'inoculation jusqu'à la mamelle, entraînant plus ou moins de modifications selon les brebis.

La mise en évidence de PCR positives, chez la brebis n°2023 qui n'a pas présenté d'isolement de *Ma* sur le lait, sur les Nll pré-scapulaire et axillaire gauches montre la persistance loco-régionale de *Ma* au site d'inoculation avec une dissémination restreinte. L'action de l'immunité locale peut expliquer cela, on ne peut cependant pas exclure que, pour une durée d'expérimentation supérieure, on ait observé une dissémination jusqu'aux Nll rétro-mammaires. De plus, les Nll pré-scapulaires, chez d'autres brebis ayant excrété

ponctuellement *Ma* (mais tardivement, brebis n°1037 et 3012), ont été positifs en PCR. En effet, les titres modérés inoculés, le retard dans la reprise de multiplication de *Ma* après inoculation (passage d'une température négative à 39°C) et l'action de l'immunité locale pourraient être responsables du retard de dissémination de *Ma*. Ceci pourrait expliquer que, chez de nombreuses brebis des lots inoculés, peu ou pas de modifications mammaires aient été observées au cours de l'expérimentation.

Conclusion

Par rapport à l'objectif de ce travail (contribution à la validation d'un protocole de reproduction expérimentale de l'infection à *Ma* qui puisse être reproductible, représentatif et opérationnel), deux conclusions peuvent être dégagées.

Tout d'abord, l'inoculation par voie sous-cutanée de 10^3 ou 10^5 UFC de la souche de référence internationale de *Mycoplasma agalactiae*, à 10 brebis Lacaune en début de lactation, a induit chez toutes, des infections durant au minimum 18 à 28 jours (durée de l'expérimentation). L'excrétion galactophore a été majoritairement (7 brebis) ponctuelle et « tardive » (à partir de J₁₈), par rapport aux modèles expérimentaux du même type déjà réalisés à l'ENVT avec des inocula de titre plus élevé (excrétion au cours de la 1^{ère} semaine). Un groupe minoritaire de 2 brebis a excrété « précocement » (à partir de J₇ ou J₁₁) et durablement (jusqu'à J₂₈). Ces 2 types d'infections ont été asymptomatiques (pas de signes physiques). Sur le plan fonctionnel, l'excrétion galactophore et la diminution de la production laitière ne sont pas systématiquement associées. Seules les brebis du second groupe ont présenté des comptages cellulaires régulièrement élevés, mais des facteurs de confusion existaient (co-infections bactériennes, éventuellement niveau laitier).

Ainsi, pour 8 brebis sur 10, il n'a été mis en évidence que des isollements ponctuels, en général non associés à des modifications nettes de la production ou l'inflammation mammaire. Le suivi n'a cependant duré que 28 jours. Ce type de résultat est conforme à la littérature sur le plan de la difficulté générale à reproduire des tableaux cliniques complets, même avec des titres plus élevés. En revanche, l'infection est en général d'extension plus large et plus durable. Aucune différence significative n'a été notée, sur les différents critères de suivi, entre les lots inoculés à 10^3 et à 10^5 UFC.

D'autre part, le modèle d'infection expérimentale proposé dans ce travail ne peut donc en l'état être recommandé pour l'évaluation, chez l'hôte naturel, du pouvoir pathogène de diverses souches ou mutants, ou encore de la protection vaccinale de divers antigènes.

Dans ce cadre, les recommandations suivantes peuvent être proposées :

- si la voie sous-cutanée est conservée :
 - en priorité, augmenter le titre de l'inoculation (au moins 10^7 UFC)
 - accessoirement sans doute, tenter d'adapter la préparation de l'inoculum à l'infection de l'animal-cible : limiter le stress bactérien d'ordre thermique ou physico-chimique avant injection

- allonger la durée de l'expérimentation.
- si un changement de voie est possible, opter pour des inoculations intra-mammaires ou conjonctivales, plus représentatives des infections naturelles et, selon certains auteurs, plus « efficaces » en vue de la colonisation durable et large de l'organisme. Même dans ce cas, les titres de 10^5 et 10^3 UFC ne sont, aujourd'hui, pas validés par la littérature.

Dans tous les cas, il est conseillé de prévenir au maximum les infections mammaires intercurrentes (antisepsie des trayons, exclusion de l'essai), et de reproduire l'expérimentation une seconde fois pour valider un profil infectieux voire clinique moyen.

Il n'existe cependant pas de modèle expérimental unique. L'essentiel semble être de choisir, parmi les quelques protocoles validés, celui qui permettra de répondre au mieux à la question spécifique posée. La priorité va donc principalement à la reproductibilité et à la représentativité par rapport à l'infection naturelle du modèle expérimental, sans oublier le bien-être animal.

Direction de l'Enseignement et de la Pédagogie

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle BRESSOLIN Aude, Dorothée

a été admis(e) sur concours en : 2004

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 septembre 2010

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Dominique BERGONIER, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle BRESSOLIN Aude, Dorothée

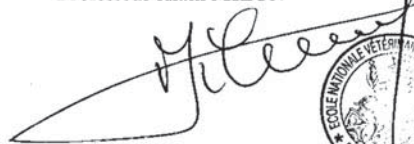

intitulée :

« Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse à Mycoplasma agalactiae chez la brebis en lactation. »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Dominique BERGONIER**



Vu :
**Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**

Vu :
**Le Président de la thèse :
Professeur Henri DABERNAT**



Vu le :
**Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**





Références bibliographiques

1. BERGONIER D.

Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse de la brebis : Etude bactériologique et sérologique. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies Lyon-Université Claude Bernard-LYON I, 1992, 85.

2. BERGONIER D., BERTHELOT X., POUMARAT F.

Contagious agalactia of Small ruminants : current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 1997, **16**, 3, 848-873.

3. BERGONIER D., BLANC M.C., BLANC M.F. *et al.*

Experimental production of Contagious agalactia in ewes: study of the serological response in serum and milk during five years. In : Mycoplasmas of Ruminants : pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. Sassari, Italy, 24-26 May, 1997. COST : European Commission (FREY J. and LEORI G., edit.), European Communities Publications Office, Luxembourg, 1997, 110-113.

4. BERGONIER D., DE CREMOUX R., RUPP R. *et al.*

Mastitis of dairy small Ruminants. Vet. Res., 2003, **34**, 689-716.

5. BUONAVOGLIA D., FASANELLA A., GRECO G. *et al.*

A study on an experimental infection of sheep with *Mycoplasma agalactiae*. Microbiologica, 1999, **22**, 27-30.

6. DAMASSA A.J., WAKENELL P.S., BROOKS D.L.

Mycoplasmas of goats and sheep. J. Vet. Diagn. Invest., 1992, **4**, 101-113.

7. DUQUESNOY F.

Modification de la production laitière par inoculation intra-mammaire chez la brebis d'un surnageant de culture de *Mycoplasma agalactiae*. Th. : Med. Vet. : Toulouse : 2000-TOU 3, 4079.

8. GALISSON C.

Evaluation clinique du pouvoir pathogène d'une souche réputée avirulente de *M. agalactiae*.
Th. : Med. Vet. : Toulouse : 2001-TOU 3, 4055.

9. HASSO S.A., AL-AUBAIDI J.M., AL-DARRAJI A.M.

Contagious agalactia in goats : its severity as related to the route of infection and pregnancy.
Small Ruminant Res., 1993, **10**, 3, 263-275.

10. MAC OWAN K.J., BRAND T.F., MC GILLVERAY N. *et al.*

Experimental infection of castrated lambs with *Mycoplasma agalactiae*. J. Hyg., Camb.,
1984, **93**, 455-463.

11. MARENDA M.S., SAGNE E., POUMARAT F. *et al.*

Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and
Mycoplasma bovis genomic diversity and species-specific sequences. Microbiology, 2005,
151, 475-89.

12. OR M.E., AK S., KAYAR A. *et al.*

Serum zinc and copper concentrations in rams experimentally infected by *Mycoplasma*
agalactiae. Slov. Vet. Res., 2005, **42**, 1/2, 31-36.

13. SANCHIS R., ABADIE G., LAMBERT M. *et al.*

Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs. Small
Ruminant Res., 1998, **27**, 31-39.

14. SANCHIS R., ABADIE G., LAMBERT M. *et al.*

Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae* :
comparative pathogenicity of six field strains. Vet. Res., 1999, **31**, 3, 329-337.

15. WATSON W.A., COTTEW G.S., ERDAG O. *et al.*

The pathogenicity of Mycoplasma organisms isolated from sheep and goats in
Turkey. Comp. Pathol., 1968, **78**, 283-291.

Annexes

	J0	J2	J4	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
T	2027												
	3024												
	2014												
	2010												
	1033												
2049													
1037													
PG2 10 ³	3044*					G	G	G	G	G	D	G	G
	2006												
	1059									D			
	2015										G	G	G
	3012											G	
PG2 10 ³	3065											G	
	1067								G				
	2023												
	3004*				G	G	G	G	G	D	G	G	G
									D		D		

* Brebis ayant excreté précocement

Annexe 1 : Isolement de *Mycoplasma agalactiae* dans le lait

		C066	I-10	J0	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
T	2027	G												
	3024	D						Strepto. sp.						
	2014	G	positif											
	1033	D	E. coli	SCN	E. coli			SCN			E. coli			E. coli
	2010	G			SCN						SCN			SCN
Pg2 10 ⁺	2049	D		SCN				SCN			SCN			SCN
	1037	G									SCN			SCN
	3044	G		E. coli	E. coli			E. coli						
	2006	G									SCN ou polybact			
	1059	D												
Pg2 10 ⁺	2015	G	SCN	SCN				SCN			SCN			SCN
	3012	D												
	3065	G												
	1067	D	SCN		SCN			SCN			SCN			
	2023	G												
Pg2 10 ⁺	3004	D	SCN	SCN	SCN			SCN						SCN

Annexe 2 : Isolement bactérien dans le lait

		Résultats PCR sur organes										Nll méd.	Nll més.	
		Isolément Nll dans le lait		Nll RM		Nll RP		Nll iliaques		Nll parotidiens				Nll préscapulaires
		G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G		
T	3024	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1037	.	J23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PC2 10 ³	3044	J11,14,16,18,21,23,25,28	J23,28	+	+
	2006	.	-
	1059	-	J21	-
PC2 10 ⁵	2015	J23,25,28	J23,25,28	+	+	+	.	.
	3012	J25	-	+	.	.
	3065	J25	-	+
	1067	J18	-
PC2 10 ⁵	2023	-	-	-	+	+	-
	3004	J17,9,11,14,16,18,23,25,28	J21	+	.	.	.	+	non prélevé

RM : Rétro-mammaire
 RP : Rétro-pharyngien
 Méd. : Médastinal
 Més. : Mésentérique

Annexe 3 : Récapitulatifs des isoléments de *Mycoplasma agalactiae* sur le lait et des PCR sur les nœuds lymphatiques (Nll)