



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 : 5329](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/5329)

To cite this version :

Séguret, Anne-Claire. *Excrétion galactophore et cinétiques sérologiques après inoculation de brebis en lactation par mycoplasma agalactiae*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2011, 150 p.

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

EXCRÉTION GALACTOPHORE ET CINÉTIQUES SÉROLOGIQUES APRÈS INOCULATION DE BREBIS EN LACTATION PAR *MYCOPLASMA AGALACTIAE*

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

SEGURET Anne-Claire, Hélène, Marie-Jeanne
Née, le 15 octobre 1984 à AMIENS (80)

Directeur de thèse : Mr. le Docteur Dominique BERGONIER

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

A Monsieur le Professeur Dabernat

Professeur à l'université Paul Sabatier

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

Hommage respectueux

A Monsieur le Professeur Dominique BERGONIER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance

A Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse et nous a beaucoup aidé lors de la réalisation de l'expérience

Qu'il trouve ici la marque de toute notre considération et notre reconnaissance

A mes parents, pour leur soutien sans faille, leur amour et les valeurs qu'ils m'ont transmises.
A mon père pour ta droiture et ton ouverture d'esprit. A ma mère, ma complice, pour ta jeunesse et ta générosité. Je vous aime.

A Dady, qui est parti sans m'avoir vu vétérinaire, tu me manques.

Aux membres de la clinique de l'astragale qui m'ont donné l'envi et la volonté de faire ce métier.

A Christine pour ta gentillesse.

A Mickael, pour m'avoir appris plein de choses en stage.

A Christophe Montagnier, pour votre patience, votre gentillesse, votre savoir, votre expérience quand je vous appelle pour un « coup de main en canine ».

A Cathy Cazelles, pour votre rigueur, votre exigence et votre talent.

A Claude Cazelles, pour votre amour du métier, pour votre sens clinique, pour votre franchise et pour tout ce que vous m'avez appris ; parce c'est à vous que je dois ma vocation rurale et que vous êtes pour moi un modèle en tant que vétérinaire mais aussi en tant qu'homme.

Aux membres de la SELARL vétérinaire Aubrac viadène avec qui je suis très heureuse de travailler.

A Josette, ou plutôt Yoyo, pour ta gentillesse et ton humour, pour ton aide avec les éleveurs et les plans de route, pour nos gouters et les dimanches chez toi.

A Michèle, pour ton franc-parler, ton dynamisme et ton humour.

A Sylvie, pour toute l'énergie que tu donnes pour me former et me dépanner, parce que c'est facile de parler avec toi.

A Pierre, pour m'avoir donné ma chance en m'acceptant dans l'équipe, pour ton ouverture d'esprit, pour ta patience face à la bavarde que je suis.

A Fred, parce que tu es un grand véto mais aussi et surtout un homme en or.

A Virginie, pour les kirs, les portos, les pizzas, pour nos rigolades.

A tous les autres (Vir l'aveyronnaise et notre « Road-Tripp » à Lyon ; Titsiana et ta joie de vivre, les secrétaires de St Amans ; toujours accueillantes ; François et Alain les 2 costaux de Nasbi), pour tous les moments que nous partageons.

Au café Dijols (Didier, Jeannette, Thibault et Flo), notre annexe pour les moqueries de Didier et les desserts de Jeannette.

Aux Docteurs Edy Georgii et Francis Juliens ainsi qu'à leurs épouses, pour m'avoir permis de faire mes premières armes en prophylaxie et en remplacement et pour m'avoir accueillie chez eux. A Viviane, pour ta gentillesse et ta volonté de bien faire, pour nos confessions mutuelles.

A mes bordelais adorés (Flo, Dam's, Jé, Chico, Carl...), pour notre amitié qui traverse les années sans s'essouffler.

A Florent, pour ta fidélité, ton humour décallé, ton intelligence. Pour ta faculté à donner sans compter et à te plier en 4 pour les autres. A la route des vins du Médoc et aux mojitos sur la plage, parce qu'être avec toi est toujours un bon moment.

A Damien, pour ta porte toujours ouverte, ta spontanéité, ta gentillesse. Pour nos délires, notre complicité, nos séances photos, pic-nick, playa. Parce qu'avec toi, je suis moi et vice-versa.

Aux alti-ligériens, qui m'ont si bien accueilli à Landos et sont devenus des amis.

A Mathilde, mon « petit fœtus » qui a suivi un à un les épisodes des feux de l'amour. Parce que personne (et y en a qui ont essayé) ne peut défaire notre amitié. Pour Abba, pour les bals.

A Auré, pour m'avoir si souvent hébergée (et parfois exploitée en cuisinière...), pour les traites des lendemains de bal et de cuite, pour nos soirées au Légende.

A Christophe, pour nos conversations téléphoniques, nos retrouvailles à Cournon, aux bœufs de Pâques, à la transhumance et à Landos. Parce que tu es si prévenant et gentil.

A Nico, parce que qui aime bien châtit bien.

A Manu, pour nos nuits blanches hors du temps, pour ton acharnement à me joindre quand la technologie est contre nous. Parce qu'un jour, les pingouins domineront le monde !!!

A Tom, même si je m'éloigne parfois, je pense toujours à toi.

A ma Béa, toi qui est toujours là pour moi, pour ta franchise, ta générosité. Pour les booms, nos bisous enflammés, pour les km sur les nationales enneigées, pour les réveillons de Noël... Je tiens fort à toi.

A ma Popo (si, si Guillaume, c'est un peu la mienne aussi), pour ta générosité et l'énergie que tu mets pour rassembler les gens. Parce qu'on a partagé trop de moments fabuleux pour que je puisse en choisir un. Je t'adore.

A Bibi, pour ton cœur en or, ta gentillesse et ton perfectionnisme. Pour cette opération où tu m'as guidé par téléphone.

A Nathou, pour ton sourire incomparable et ta douceur. Pour les soirées chez tonton et à l'X club.

A Marion, pour ta capacité à rire de tout et ta finesse. Pour tout ce que nous avons traversé ensemble, pour les nuits à discuter, les despé chez tonton et tant d'autres moments.

A Guillaume, connu jusqu'au fin fond de l'Aveyron comme Hyper Dr Lourd, pour ton goût vestimentaire sûr, pour les boomettes, pour Patrick Sébastien, pour ta bonne humeur, pourvu que ça dure...

A Cassou, parce que tu es un ange qui pense toujours aux autres, je t'admire.

A Pépé, pour ta poésie, ta finesse et les jolis surnoms que tu nous donnes.

A Maryloo, pour nos karaokés magnifiques sur les L5, pour les soirées sushi-champagne, pour ton humour noir tellement irrésistible.

A Aude, pour nos suées à Movida, pour les coups de pieds de ces foutues brebis, pour avoir sauvé Jeannette.

A Shyk, pour tes cocktail « attrape-gonzesse » et pour ta bonne humeur.

A Canari, pour ta créativité et ton humour.

A Amandine, pour les soirées à Movida.

A Fanny, pour ton rire et toutes tes aventures.

A Crub, pour un semestre partagé en bovine.

A Clément, pour tes aventures professionnelles.

A Déb, pour tes déguisements mémorables et tes gâteaux surprises.

A Caro, pour X paquets de cigarettes, pour une soirée dans un bac d'autops, pour un réveillon de Noël inoubliable !

Table des matières

Introduction générale.....	17
Partie bibliographique : Mycoplasmes et agalactie contagieuse des petits ruminants.....	19
1- Caractères généraux des mycoplasmes	20
1.1- Importance des mycoplasmes	20
1.1.1- Importance scientifique	20
1.1.2- Importance médicale et économique.....	20
1.1.3- Importance réglementaire.....	21
1.1.4- Importance et situation épidémiologique en France.....	22
1.2- Phylogénie et taxonomie	24
1.2.1- Phylogénie.....	24
1.2.2- Taxonomie	25
1.3- Morphologie et structure.....	27
1.4- Physiologie et écologie.....	28
1.5- Génome, composition en bases et information génétique.....	29
1.6- Facteurs de virulence et pathogénicité.....	32
1.6.1- Adhésion.....	32
1.6.2- Dommages cellulaires directs : toxines et produits du métabolisme.....	34
1.6.3- Effets mitotiques et apoptotiques, pouvoir oncogène ?	35
1.6.4- Formation de biofilms.....	36
1.7- La variabilité intraspécifique.....	37
1.7.1- Hétérogénéité génomique	37
1.7.2- Hétérogénéité protéique	37
1.7.3- Hétérogénéité antigénique.....	37
2- Le syndrome Agalactie contagieuse.....	40
2.1- Importance de l'agalactie contagieuse	40
2.2- Etiologie	40
2.3- Tableaux cliniques	42
2.3.1- Agalactie contagieuse à <i>Mycoplasma agalactiae</i> (Ma).....	42
2.3.1.1- Forme typique	42
2.3.1.2- Formes atypiques	43
2.3.1.3- Formes asymptomatiques.....	43
2.3.1.4- La question de la faune sauvage	44
2.3.2- Agalactie contagieuse à <i>Mycoplasma mycoides capri</i> (Mmc) :.....	44
2.3.2.1- Chez les adultes	44
2.3.2.2- Chez les jeunes.....	45
2.3.3- Agalactie contagieuse à <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp <i>capricolum</i> (Mcc):.....	45
2.3.3.1- Chez les adultes	45
2.3.3.2- Chez les jeunes.....	46
2.3.4- Agalactie contagieuse à <i>Mycoplasma putrefaciens</i> (Mp)	46
2.4- Epidémiologie descriptive	47
2.4.1- Distribution géographique de l'agalactie contagieuse.....	47
2.4.2- Distribution géographique des différentes mycoplasmoses	49
2.4.3- Evolution de la situation épidémiologique.....	52
2.4.3.1- Evolution dans le monde	52
2.4.3.2- Evolution dans les zones infectées	52
2.4.3.3- Evolution dans les troupeaux infectés	53
2.4.3.3.1- Incidence	53
2.4.3.3.2- Prévalence	54
2.4.3.3.3- Persistance.....	54
2.5- Epidémiologie analytique	55

2.5.1- Sources de mycoplasmes.....	55
2.5.1.1- Les animaux malades.....	55
2.5.1.2- Les animaux cliniquement guéris	56
2.5.1.3- Les porteurs sains	57
2.5.1.3.1- Les caprins domestiques	57
2.5.1.3.2- Les ovins domestiques	57
2.5.1.3.3- La faune sauvage.....	57
2.5.1.4- L'environnement.....	58
2.5.2- Voies de pénétration	58
2.5.3- Modes de transmission	60
2.5.3.1- Transmission verticale.....	60
2.5.3.2- Transmission horizontale	60
2.5.3.2.1- Transmission horizontale directe	60
2.5.3.2.2- Transmission horizontale indirecte.....	60
2.5.4- Facteurs de sensibilité.....	61
2.5.4.1- Facteurs animaux.....	61
2.5.4.1.1- L'espèce	61
2.5.4.1.2- La race.....	61
2.5.4.1.3- L'âge	62
2.5.4.1.4- Le sexe et le statut physiologique	62
2.5.4.1.5- Le statut immunitaire	62
2.5.4.2- Facteurs environnementaux.....	62
2.5.4.2.1- Le mode d'élevage.....	62
2.5.4.2.2- Les facteurs climatiques.....	62
2.6- Diagnostic.....	63
2.6.1- Diagnostic clinique et différentiel.....	63
2.6.2- Prélèvements [7, 10, 23]	64
2.6.2.1- Sur les animaux malades	64
2.6.2.2- Sur les animaux sans signes cliniques	64
2.6.3- Culture et isolement.....	66
2.6.4- Identification	67
2.6.4.1- Épreuves biochimiques	67
2.6.4.2- Identification sérologique.....	68
2.6.4.3- Détection génomique.....	69
2.6.5- Diagnostique sérologique.....	70
2.6.5.1- Fixation du complément.....	70
2.6.5.2- Épreuves immuno-enzymatiques.....	70
2.6.5.3- Epreuve d'immuno-empreinte sur membrane (immunoblot)	72
2.7- Traitement	72
2.7.1- Choix du schéma thérapeutique	72
2.7.2- Limites du traitement	74
2.8- Prophylaxie.....	76
2.8.1- Prophylaxie médicale.....	76
2.8.1.1- Chimio-prévention	76
2.8.1.2- Immunoprévention	76
2.8.1.2.1- Vaccins inactivés	76
2.8.1.2.2- Vaccins vivants atténués	77
2.8.2- Prophylaxie sanitaire	78
2.8.2.1- Contrôle de la maladie dans un troupeau infecté	78
2.8.2.1.1- Réduction des sources de mycoplasmes	78
2.8.2.1.2- Limitation de la transmission.....	79
2.8.2.2- Contrôle dans les régions infectées.....	80

2.8.2.2.1- Déclaration obligatoire des cas cliniques.....	81
2.8.2.2.2- Qualification des cheptels	81
2.8.2.2.3- Gestion des cheptels infectés	83
2.8.2.2.4- Gestion des transactions et des mouvements d'animaux	84
Partie expérimentale	85
1- Introduction	86
2- Matériel et méthodes	86
2.1- Les animaux.....	86
2.1.1- Description des animaux	86
2.1.2- Période pré-inoculation	87
2.1.2.1- Logement	87
2.1.2.2- Alimentation	87
2.1.2.3- Mises bas	87
2.1.2.4- Soins	88
2.1.3- Vérification de la négativité vis-à-vis de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	89
2.1.4- Constitution des lots.....	90
2.1.4.1- Présentation des lots	90
2.1.4.2- Critères de constitution des lots.....	90
2.1.5- Période post-inoculation	91
2.1.5.1- Logement et soins	91
2.1.5.2- Alimentation	92
2.2- Inoculum et inoculation	92
2.2.1- Préparation des inoculum.....	92
2.2.2- Inoculation	92
2.3- Réalisation des prélèvements	93
2.3.1- Prélèvements pré-inoculation	93
2.3.2- Prélèvements post-inoculation	93
2.3.2.1- Sur les mères.....	93
2.3.2.2- Sur les agneaux.....	94
2.4- Bactériologie	94
2.5- Sérologies	94
2.6- Analyse des données.....	95
3- Résultats	96
3.1- Résultats bactériologiques.....	96
3.1.1- Bactériologies mycoplasmiques	96
3.1.2- Bactériologies non spécifiques	98
3.2- Résultats sérologiques.....	100
3.2.1- Reproductibilité : étude de la variabilité inter-laboratoires	100
3.2.1.1- Etude de la variabilité inter-laboratoire brebis par brebis.....	100
3.2.1.2- Etude de la variabilité inter-laboratoire : synthèse	111
3.2.2- Etude sérologique.....	114
3.2.2.1- Etude de la brebis 1037.....	117
3.2.2.2- Etude de la brebis 3044.....	118
3.2.2.3- Etude de la brebis 2006.....	119
3.2.2.4- Etude de la brebis 1059.....	120
3.2.2.5- Etude de la brebis 2015.....	121
3.2.2.6- Etude de la brebis 3012.....	122
3.2.2.7- Etude de la brebis 3065.....	123
3.2.2.8- Etude de la brebis 1067.....	124
3.2.2.9- Etude de la brebis 2023.....	125
3.2.2.10- Etude de la brebis 3004.....	126
3.2.2.11- Etude du lot 1	127

3.2.2.12- Etude du lot 2	128
3.2.2.13- Etude comparative des lots	129
3.2.3- Etude du seuil :	129
4- Discussion	132
4.1- Discussion des méthodes	132
4.1.1-Sélection et gestion des animaux	132
4.1.2- Inoculation	134
4.1.3- Plan expérimental	135
4.1.4- ELISA	135
4.2- Discussion des résultats	136
4.2.1- Infection	136
4.2.2- Bactériologie	137
4.2.3- Sérologie	138
4.2.3.1- Reproductibilité : variabilité inter-laboratoires	138
4.2.3.2- Discussion du seuil	139
Conclusion	142
Bibliographie	144
Annexe 1 : Formule du milieu d'Eaton (Manuel de l'OIE 2005)	149
Annexe 2 : Protocole d'ensemencement (Manuel de l'OIE)	149
Annexe 3 : examen clinique et bactériologique de la mamelle des brebis, traitements mis en place	150

Table des illustrations

- **Tableaux :**

Tableau 1 : espèces de mycoplasmes isolés sur des bovins français (902 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces bovins [40]

Tableau 2 : espèces de mycoplasmes isolés sur des ovins français (114 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces ovins [40]

Tableau 3 : espèces de mycoplasmes isolés sur des caprins français (902 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces caprins [40]

Tableau 4 : espèces de mycoplasmes isolés sur des ruminants sauvages français (902 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces animaux [40]

Tableau 5 : mycoplasmes impliqués dans le syndrome Agalactie Contagieuse, souches de référence, espèces cibles et formes cliniques courantes [9]

Tableau 6 : cas d'agalactie contagieuse rapports dans les pays méditerranéens entre 1965 et 2004 [9]

Tableau 7 : caractéristiques étiologiques et épidémiologiques de l'agalactie contagieuse dans plusieurs pays [10]

Tableau 8 : fréquence des signes cliniques de l'agalactie contagieuse en fonction du mycoplasme causal

Tableau 9 : dates des mise-bas

Tableau 10 : signes cliniques des brebis malades, traitements mis en places et résultats cliniques

Tableau 11 : récapitulatif des critères de constitution des lots et lots définitifs

Tableau 12 : résultats des bactériologies mycoplasmiques sur le lait des brebis du lot 1

Tableau 13 : résultats des bactériologies mycoplasmiques sur le lait des brebis du lot 2

Tableau 14 : Résultats des bactériologies non spécifiques réalisées sur le lait des brebis du lot témoin négatif

Tableau 15 : Résultats des bactériologies non spécifiques et myoplasmiques réalisées sur le lait des brebis du lot 1

Tableau 16 : Résultats des bactériologies non spécifiques et myoplasmiques réalisées sur le lait des brebis du lot 2

Tableau 17 : Comparaison des sérologies de la brebis 1037 par les laboratoires A et B

Tableau 18 : Comparaison des sérologies de la brebis 3044 par les laboratoires A et B

Tableau 19 : Comparaison des sérologies de la brebis 2006 par les laboratoires A et B

Tableau 20 : Comparaison des sérologies de la brebis 1059 par les laboratoires A et B

Tableau 21 : Comparaison des sérologies de la brebis 2015 par les laboratoires A et B

Tableau 22 : Comparaison des sérologies de la brebis 3012 par les laboratoires A et B

Tableau 23 : Comparaison des sérologies de la brebis 3065 par les laboratoires A et B

Tableau 24 : Comparaison des sérologies de la brebis 1067 par les laboratoires A et B

Tableau 25 : Comparaison des sérologies de la brebis 2023 par les laboratoires A et B

Tableau 26 : Comparaison des sérologies de la brebis 3004 par les laboratoires A et B

Tableau 27 : moyennes des titres sérologiques des brebis du lot 1 par les laboratoires A et B

Tableau 28 : moyennes des titres sérologiques des brebis du lot 2 par les laboratoires A et B

Tableau 29 : moyennes des titres sérologiques de toutes les brebis par les laboratoires A et B

Tableau 30 : titres sérologiques en pourcentage des brebis (données du laboratoire B)

Tableau 31 : données statistiques sur les titres sérologiques (données du laboratoire B)

Tableau 32 : comparaison des statuts sérologiques et bactériologiques des brebis

Tableau 33 : Valeurs caractérisant la brebis 1037

Tableau 34 : Valeurs caractérisant la brebis 3044

Tableau 35 : Valeurs caractérisant la brebis 2006

Tableau 36 : Valeurs caractérisant la brebis 1059

Tableau 37 : Valeurs caractérisant la brebis 2015

Tableau 38 : Valeurs caractérisant la brebis 3012

Tableau 39 : Valeurs caractérisant la brebis 3065

Tableau 40 : Valeurs caractérisant la brebis 1067

Tableau 41 : Valeurs caractérisant la brebis 2023

Tableau 42 : Valeurs caractérisant la brebis 3004

Tableau 43 : Valeurs caractérisant le lot 1

Tableau 44 : Valeurs caractérisant le lot 2

Tableau 45 : Moyennes arithmétiques des titres des lots 1 et 2

Tableau 46 : Statuts sérologiques des brebis en fonction des seuils de positivité (données du laboratoire B)

Tableau 47 : Statuts sérologiques des brebis en fonction des seuils de positivité (données du laboratoire A)

- **Figures** :

Figure 1 : phylogénie basée sur l'ARNr 16S [43]

Figure 2 : cours bergonier

Figure 3 : répartition géographique de l'agalactie contagieuse en France [11]

Figure 4 : Cinétique des mise-bas

Figure 5 : Profils sérologiques de la brebis 1037

Figure 6 : Profils sérologiques de la brebis 3044

Figure 7 : Profils sérologiques de la brebis 2006

Figure 8 : Profils sérologiques de la brebis 1059

Figure 9 : Profils sérologiques de la brebis 2015

Figure 10 : Profils sérologiques de la brebis 3012

Figure 11 : Profils sérologiques de la brebis 3065

Figure 12 : Profils sérologiques de la brebis 1067

Figure 13 : Profils sérologiques de la brebis 2023

Figure 14 : Profils sérologiques de la brebis 3004

Figure 15 : cinétiques des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 1

Figure 16 : cinétiques des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 2

Figure 17 : cinétiques des moyennes arithmétiques des titres sérologiques de toutes les brebis

Figure 18 : Cinétique des titres sérologique de la brebis 1037

Figure 19 : Cinétique des titres sérologique de la brebis 3044

Figure 20 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 2006

Figure 21 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 1059

Figure 22 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 2015

Figure 23 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 3012

Figure 24 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 3065

Figure 25 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 1067

Figure 26 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 2023

Figure 27 : Cinétique des titres sérologique de la brebis 3004

Figure 28 : Cinétique des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 1

Figure 29 : Cinétique des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 2

Figure 30 : Cinétique des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis des lots 1 et 2

Figure 31 : Statuts sérologiques des brebis des lots 1 et 2 en fonction du seuil de positivité

Introduction générale

L'agalactie contagieuse des ovins et caprins est un syndrome principalement caractérisé cliniquement par des atteintes mammaires, articulaires et oculaires et parfois respiratoires. Il peut être causé par différentes bactéries du genre *Mycoplasma* : *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* Large Colony récemment renommé *Mycoplasma mycoides capri*, *Mycoplasma capricolum capricolum* et *Mycoplasma putrefaciens*.

De part sa très large distribution mondiale et les pertes économiques importantes qu'elle provoque dans certaines zones, l'agalactie contagieuse constitue une entrave sanitaire majeure au développement des productions laitières ovines et caprines. De ce fait, elle figurait sur l'ancienne liste B de L'OIE (Office International des Epizooties), qui regroupait des maladies transmissibles importantes du point de vue socio-économique et/ou sanitaire et ayant un impact sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale (aujourd'hui fusionnée avec la liste A).

Une disparité des statuts vis-à-vis de l'agalactie contagieuse existe dans le monde entre les différentes zones d'élevage, avec des régions indemnes et des régions atteintes sporadiquement ou enzootiquement. Très répandue dans les pays circumméditerranéens, l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* sévissait historiquement en France sous forme enzootique dans deux bassins d'élevage laitier : la Savoie et la Haute-Savoie chez les caprins d'une part, et les Pyrénées-Atlantiques (Pays Basque et Béarn) chez les ovins d'autre part. Dans notre pays, des programmes de lutte reposant sur l'application volontaire de réglementations départementales ont été mis en place. L'objectif de ce type de prophylaxie sanitaire est d'abord de circonscrire progressivement l'infection à certaines zones, puis, à terme, de l'éradiquer. Cet objectif peut être considéré comme atteint dans les départements savoyards, où aucune infection n'a été détectée depuis 2002. En revanche, malgré ces efforts, la maladie persiste toujours dans les Pyrénées-Atlantiques. En effet, après une assez longue période de diminution de la prévalence et de l'incidence grâce à l'application de mesures sanitaires depuis 1989, on assiste depuis 2006 à une nette recrudescence du nombre de cas déclarés ou détectés. Ceci montre, au travers d'un cas particulier, les limites des programmes sanitaires mis en œuvre dans certaines conditions. Ces limites résident bien sûr dans les caractéristiques mêmes de l'infection (forte contagiosité, fréquence et durée du portage asymptomatique...). A ceci s'ajoutent, entre autres, les difficultés de contrôle des mouvements d'animaux, les réticences à l'abattage total lors de positivité avérée et les limites de tout système diagnostique, au terme de dépistage de nouveaux infectés ou de surveillance

des animaux. Le dépistage précoce et performant des animaux ou des troupeaux infectés est un élément clef de la lutte contre l'agalactie contagieuse puisqu'il conditionne l'attribution d'un statut et la mise en œuvre des mesures de prévention de la transmission. Les caractéristiques des techniques de détection (sensibilité, spécificité, précocité, ...) sont donc l'une des clefs de voute de ce type de prophylaxie sanitaire efficace et durable.

Nous présenterons dans la première partie les propriétés marquantes des mycoplasmes et les principales caractéristiques de l'agalactie contagieuse. En effet, au moment où l'épizootie s'étend de façon significative dans les Pyrénées, il était important de refaire un point bibliographique, en particulier sur le diagnostic, l'épidémiologie et la maîtrise de cette infection.

Dans une seconde partie, nous présenterons notre expérimentation ayant trait à la reproduction expérimentale de l'infection à *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis laitière. Dans le contexte de la réévaluation des outils de diagnostic et de dépistage, le but de notre étude était de comparer l'excrétion de l'agent infectieux dans le lait et les profils sérologiques induits par l'inoculation de la souche de référence.

**Partie bibliographique : Mycoplasmes et agalactie
contagieuse des petits ruminants**

1- Caractères généraux des mycoplasmes

1.1- Importance des mycoplasmes

1.1.1- Importance scientifique

Les mycoplasmes ont tout d'abord une importance scientifique puisqu'ils sont les plus simples et les plus petits microorganismes doués d'autoréplication connus et ont donc fait l'objet de multiples recherches concernant leur origine et leur évolution. Ils ont également servi de modèles expérimentaux à maintes reprises.

1.1.2- Importance médicale et économique

Ces microorganismes ont aussi une grande importance médicale car les mycoplasmes (au sens large : mollicutes ou famille de microorganismes à « enveloppe molle ») comprennent des espèces pathogènes pour l'homme (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*), pour les animaux (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Haemoplasma*) ou pour les plantes et les insectes (*Spiroplasma*, *Phytoplasma*) [1].

Par la suite, nous nous intéresserons aux mycoplasmes qui affectent les animaux et plus particulièrement les petits ruminants. Plus de 100 espèces de mycoplasmes ont été nommées, mais bien plus d'espèces ont été isolées sans être nommées [1].

Parmi les nombreuses espèces de mycoplasmes isolées, beaucoup sont commensales des muqueuses animales et peuvent sporadiquement être impliquées dans des maladies associées à des virus ou des bactéries. D'autres, au contraire, sont des pathogènes avec une spécificité d'hôte plus ou moins stricte. Parmi les différents groupes phylogéniques (phylogénie basée sur l'ARNr 16s), on distingue le groupe mycoïdes, qui comprend 6 espèces et plusieurs espèces apparentées. Les pathogènes les plus importants pour les petits ruminants se trouvent dans ce groupe (Figure 1). Un autre groupe important est celui de *M. agalactiae* et *M. bovis*. L'infection à *M. bovis* bien que non listée par L'OIE (Office International des Epizooties) a une importance économique majeure car elle est responsable de pneumonies, de polyarthrites, de mammites et d'otites moyennes et profondes chez les bovins. Sa répartition est mondiale. Les autres mycoplasmes pathogènes majeurs des petits ou grands ruminants causent différentes maladies en fonction de leurs organes cibles [3].

Présentes dans le monde entier, les mycoplasmoses du mouton et de la chèvre représentent un problème socio-économique important, particulièrement dans les régions où ces animaux constituent une part importante des ressources de lait et de viande pour les populations. De nombreuses espèces de mycoplasmes sont rencontrées chez les petits ruminants, particulièrement chez les caprins, où la présence de mélange d'espèces au sein d'un troupeau voire d'un même animal est chose fréquente [16].

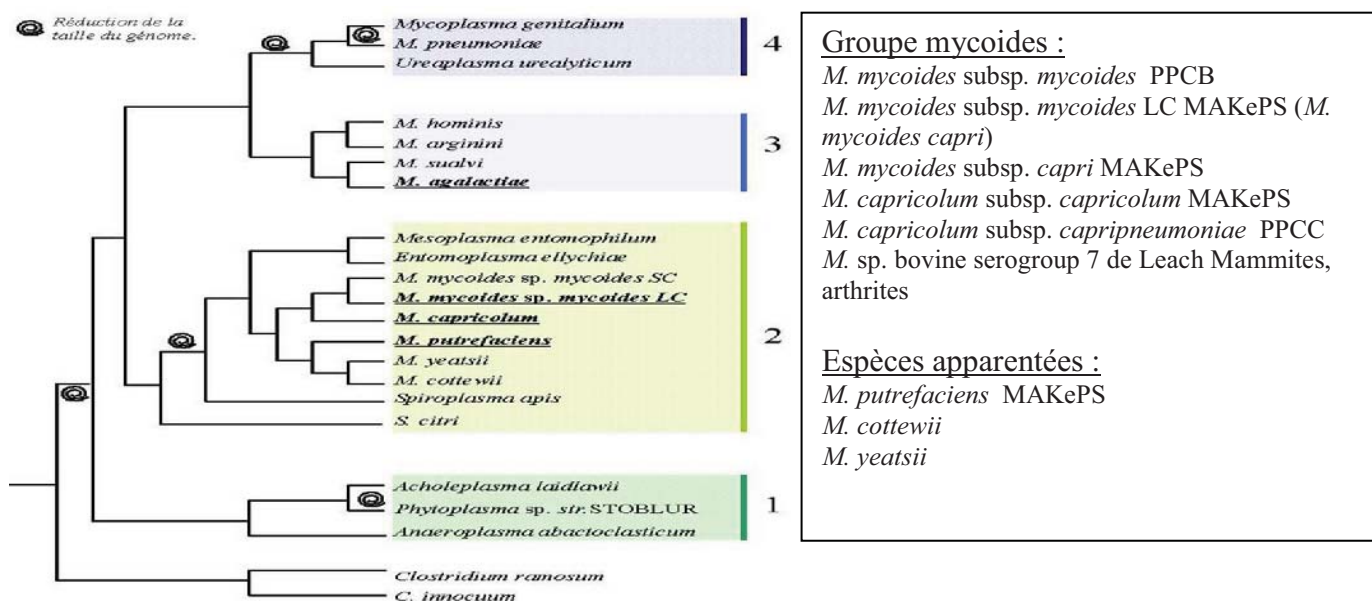


Figure 1 : phylogénie basée sur l'ARNr 16S [43]

1.1.3- Importance réglementaire

L'OIE, ou Organisation Mondiale de la santé Animale, avait établi une classification des maladies réglementées en 2 listes qui ont aujourd'hui fusionné, mais qui traduisait bien l'importance relative de ces maladies.

L'ancienne liste A regroupait les maladies transmissibles ayant un pouvoir de diffusion important et une gravité particulière, susceptible de s'étendre au-delà des frontières nationales, dont les conséquences socio-économiques ou sanitaires sont graves et dont l'incidence sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale est très importante [4]. Parmi les mycoplasmoses des ruminants, la péripneumonie contagieuse bovine appartenait à cette liste. Cette maladie, causée par *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony, touche uniquement les bovidés et est actuellement présente en Afrique et suspectée en Asie où elle évolue souvent de manière insidieuse avec des porteurs chroniques. Elle peut parfois occasionner des pertes importantes (50% de mortalité) dans certains cheptels. L'Amérique, l'Australie et l'Europe sont actuellement indemnes. Elle se caractérise par des symptômes généraux (fièvre, abattement, inappétence...) et respiratoires (dyspnée pouvant aller jusqu'à l'orthopnée, toux quinteuse, jetage...) [5].

Les maladies de la liste B étaient quant à elles des maladies transmissibles, considérées comme importantes du point de vue socio-économique et/ou sanitaire au niveau national et dont les effets sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale ne sont pas négligeables [4]. L'agalactie contagieuse des petits ruminants que nous

développerons ultérieurement, et la péripneumonie contagieuse caprine (*M. capricolum* subsp. *Capripneumoniae*) appartenait à cette liste.

Aujourd'hui, ces trois unités nosologiques appartiennent à la liste unique de l'OIE.

1.1.4- Importance et situation épidémiologique en France

En France, une étude réalisée entre 2003 et 2007 par le réseau d'épidémiosurveillance VIGIMYC a précisé la prévalence des différentes espèces de mycoplasmes des bovins, des ovins, des caprins ainsi que de la faune sauvage.

Chez les bovins français, le mycoplasme pathogène le plus fréquent dans les cultures reçues par ce réseau de type « passif » est *M. bovis* (55,9%), qui affecte principalement des jeunes sous forme de bronchopneumonie. Viennent ensuite des mycoplasmes opportunistes tels que *M. bovirhinis* (27,3%), *M. arginini* (13,7%), *M. alkalescens* (1,2%) ou *M. bovis genitalium* (0,4%) (tableau 1).

Tableau 1 : espèces de mycoplasmes isolés sur des bovins français (902 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces bovins [40]

Espèce mycoplasmatique	Nombre d'isolats	Pourcentage	Pouvoir pathogène
<i>M. bovis</i>	541	55,9	Pathogène
<i>M. bovirhinis</i>	264	27,3	Opportuniste
<i>M. arginini</i>	133	13,7	Opportuniste
<i>M. alkalescens</i>	12	1,2	Pathogène ?
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	7	0,7	Opportuniste
<i>M. bovis genitalium</i>	4	0,4	Opportuniste
<i>M. canadense</i>	3	0,3	Pathogène ?
<i>M. mycoides capri</i>	2	0,2	Pathogène ?
<i>M. canis</i>	1	0,1	Pathogène ?
<i>M. agalactiae</i>	1	0,1	Pathogène ?
<i>M. mycoides mycoides</i> Small Colony	0	0	Pathogène

Pathologie	Inconnue	Pneumonie	Mammite	Arthrite	Autre
Pourcentage	13,5	83	1	2	0,5

Age des animaux	Inconnu	Jeunes	Adultes
Pourcentage	27	65,5 (30,5 non sevrés, 35 sevrés)	7,5

Chez les ovins, le mycoplasme le plus fréquemment isolé est, dans le cas particulier de ce réseau, l'opportuniste *M. arginini* (72%). *M. agalactiae* et *M. mycoides capri*, responsables du syndrome agalactie contagieuse, arrivent respectivement en deuxième (15,5%) et troisième (5%) position. La pathologie la plus rencontrée dans cette étude est la pneumonie qui affecte surtout les jeunes (tableau 2).

Tableau 2 : espèces de mycoplasmes isolés sur des ovins français (114 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces ovins [40]

Espèce mycoplasmatique	Nombre d'isolats	Pourcentage	Pouvoir pathogène
<i>M. arginini</i>	74	72	Opportuniste
<i>M. agalactiae</i>	16	15,5	Pathogène
<i>M. ovipneumoniae</i>	5	5	Pathogène
<i>M. mycoides capri</i>	5	5	Pathogène
M. species ovine group 11	1	1	Non pathogène
<i>M. bovirhinis</i>	1	1	Opportuniste
<i>A. laidlawii</i>	1	1	Opportuniste
<i>M. mycoides mycoides</i> Small Colony	0	0	Pathogène

Pathologie	Inconnue	Pneumonie	Mammite	Arthrite	Kératite	Avortement	Suivi sanitaire
Pourcentage	10	62	1	4	3	1	19

Age des animaux	Inconnu	Jeunes	Adultes
Pourcentage	57	30	13

Chez les caprins, *M. mycoides capri* (44%), *M. capricolum capricolum* (29%) et *M. putrefaciens* (12%), responsables de l'agalactie contagieuse, sont le plus fréquemment isolés (tableau 3).

Tableau 3 : espèces de mycoplasmes isolés sur des caprins français (902 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces caprins [40]

Espèce mycoplasmatique	Nombre d'isolats	Pourcentage	Pouvoir pathogène
<i>M. mycoides capri</i>	260	44	Pathogène
<i>M. capricolum capricolum</i>	171	29	Pathogène
<i>M. putrefaciens</i>	73	12	Pathogène
<i>M. arginini</i>	48	8	Opportuniste
<i>M. yeatsii</i>	24	4	Non pathogène
<i>M. agalactiae</i>	10	2	
<i>M. ovipneumoniae</i>	1	0,2	Pathogène
<i>M. mycoides mycoides</i> Small Colony	0	0	Pathogène

Pathologie	Inconnue	Agalactie contagieuse	Suivi sanitaire
Pourcentage	22,5	Pneumonie : 16,5 ; Mammite : 26,5 ; Arthrite : 9	25,5

Age des animaux	Inconnu	Jeunes	Adultes
Pourcentages	27	17	56

Enfin, sur la faune sauvage, seuls *M. mycoides capri* et *M. agalactiae* ont été isolés sur *Capra ibex* et *M. bovis* sur *Meles meles* (tableau 4) [39, 40]. Les souches de *M. agalactiae*

isolées sur des bouquetins dans les Alpes sont atypiques et sans aucun lien avec l'enzootie historique des caprins de cette région [43].

Tableau 4 : espèces de mycoplasmes isolés sur des ruminants sauvages français (902 isolats) entre 2003 et 2007, pathologies et tranches d'âges de ces animaux [40]

Espèce mycoplasmique	Nombre d'isolats	Hôte	Pouvoir pathogène	Signes cliniques
<i>M. mycoides capri</i>	8	Capra ibex	Pathogène	Kératoconjonctivite et broncho-pneumonie
<i>M. agalactiae</i>	4	Capra ibex	Pathogène	Kératoconjonctivite et broncho-pneumonie
<i>M. bovis</i>	1	Meles meles	Pathogène	Broncho-pneumonie

1.2- Phylogénie et taxonomie

1.2.1- Phylogénie

Les mycoplasmes sont les plus simples procaryotes connus, capables d'autoréplication. Leur origine et leur évolution ont suscité de nombreuses interrogations.

Deux hypothèses distinctes quant à leur origine existent. La première soutient que les mycoplasmes sont les descendants d'une bactérie primitive qui aurait existé avant le développement du peptidoglycane de paroi. La seconde indique que les mycoplasmes sont des formes L très évoluées, dérivées d'eubactéries Gram + à faible teneur en G et en C. En effet, les formes L proviennent spontanément d'assez nombreuses espèces bactériennes ou sont induites par la présence d'agents inhibiteurs de la synthèse de la paroi. Les cellules obtenues, dépourvues de paroi, sont capable de survivre et même de se développer en milieu osmotiquement équilibré et certaines peuvent, contrairement aux mycoplasmes, subir une transformation inverse vers la forme bactérienne d'origine. Les mycoplasmes auraient ainsi évolué à partir de bactéries Gram+ par un processus comprenant des réductions successives de la taille du génome et une perte de la paroi. Les microorganismes les plus proches dans cet arbre phylogénique sont deux *Clostridium* : *C. innoculum* et *C. ramosum*. Cette seconde hypothèse est actuellement privilégiée d'après les études de bases moléculaires hautement conservées comme les ARN ribosomiques 16S et 5S.

La grande variabilité phénotypique des mycoplasmes soulève une autre question : celle de l'origine polyphylétique (évolution à partir de plusieurs espèces de bactéries à paroi)

ou monophylétique (évolution à partir d'une seule espèce bactérienne). Dans la seconde hypothèse, la grande variabilité des mycoplasmes s'expliquerait par un processus d'évolution très rapide caractéristique du groupe. Cependant, à l'heure actuelle, l'hypothèse polyphylétique est privilégiée.

Enfin, l'étude de certains gènes a permis de construire un arbre phylogénétique.

M. agalactiae est phylogénétiquement très proche de *M. bovis* : l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S de ces deux espèces a montré 99,47 % de similarité. Cependant le pourcentage estimé d'homologie au niveau génomique, entre *M. agalactiae* et *M. bovis*, n'est que de 40 %. Ces mycoplasmes sont tous deux pathogènes de ruminants, ils ont des organes cibles similaires et peuvent induire les mêmes symptômes, mais ont un spectre d'hôte spécifique : *M. agalactiae* est isolé d'ovins ou de caprins, alors que *M. bovis* est isolé de bovins (bien que de rares exceptions aient été rapportées). Tout deux appartiennent en effet au groupe phylogénétique "hominis". Contrairement au groupe "mycoïdes" qui ne comporte que des pathogènes de ruminants, le spectre d'hôte des mycoplasmes du groupe "hominis" s'étend de *M. hominis*, pathogène humain, à *M. pulmonis*, pathogène de rongeurs, en passant par *M. crocodyli*, pathogène de reptiles. Avec *M. conjunctivae*, *M. bovis* et *M. agalactiae* constituent les pathogènes de ruminants de ce groupe [16].

Les autres mycoplasmes responsables de l'agalactie contagieuse appartiennent au groupe « mycoïdes » et sont responsables d'un syndrome parfois dénommé MAKEPS pour « mammite, arthrite, kératite, pneumonie, septicémie ». Ce groupe semble relativement éloigné dans l'arbre. Cependant, le séquençage des souches types a montré que 14% des gènes de *M. agalactiae* proviennent de transferts horizontaux à partir du groupe mycoïdes.

1.2.2- Taxonomie

Les mycoplasmes étaient anciennement appelés PPLO (Pleuro-Pneumonia Like Organism), car le premier représentant décrit de leur groupe fut l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine. Plus tard, leur polymorphisme et leur structure pseudo-mycélienne ont été à l'origine de l'attribution du nom de mycoplasme (forme de champignon). Ils appartiennent à la classe des mollicutes (peau molle) et la division des tenericutes.

Les tenericutes sont des procaryotes sans paroi, incapables de synthétiser les précurseurs du peptidoglycane. Ils sont entourés d'une membrane unitaire, la membrane cytoplasmique. Ces cellules sont très polymorphes, allant de la vésicule de grande taille,

déformable, jusqu'à l'élément filtrant très petit (0,2 µm), en passant par des formes filamenteuses ramifiées ou non. Elles se reproduisent par bourgeonnement, par fragmentation et/ou par scissiparité. Elles sont immobiles ou rarement mobiles par glissement. Il n'existe pas de forme de repos. La coloration de Gram est absente. Ces bactéries exigent pour la plupart un milieu de croissance complexe pour leur culture et, au cours de leur développement, elles ont tendance à pénétrer dans les milieux solides pour former des colonies caractéristiques dites en « œufs sur le plat ». Elles ressemblent aux formes L engendrées par de nombreuses espèces bactériennes, mais, contrairement à ces dernières, elles sont incapables de subir une transformation inverse en synthétisant une paroi. Les espèces peuvent être différenciées sur la base de leur exigence en cholestérol et en acides gras à longues chaînes. Le contenu en G+C de leur ARNr est de 43 à 48%, c'est-à-dire plus bas que celui des Gracilicutes et des Firmicutes (50-54%). Le GC% de leur ADN est également très bas (23-46%). La taille de leur génome est aussi inférieure puisque de 0,5 à 1×10^9 Daltons. Tous les mycoplasmes sont résistants aux β -lactamines. Ils peuvent être saprophytes, parasites ou pathogènes.

Au sein de la division des Tenericutes et de la classe des mollicutes, on distingue 4 ordres : les Mycoplasmatales, les Entomoplasmatales, les Acholeplasmatales et les Anaeroplasmatales. L'ordre des Mycoplasmatales regroupe 3 familles. La première et la plus importante, celle des *Mycoplasmataceae* comprend 2 genres : *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Les *Ureaplasma* se distinguent des *Mycoplasma* par leur propriété uréasique.

Les propriétés communes aux organismes de la famille des *Mycoplasmataceae* sont les suivantes :

- Coccoïdes ou filamenteux ;
- Taille réduite du génome : 600-1350 kpb ;
- Faible teneur Guanine-Cytosine : 23-40% ;
- Anaérobies facultatifs ;
- Exigeants en stérols pour leur croissance ;
- Codons UGA comme codon Tryptophane ;
- Ils utilisent tous comme source principale d'énergie le métabolisme des sucres ou de l'arginine (genre *Mycoplasma*) ou de l'urée (genre *Ureaplasma*) ;
- L'espèce type de cette famille est *Mycoplasma mycoides* ;
- 13 des 102 espèces connues de mycoplasmes et 1 des 5 espèces d'ureaplasmes ont été isolées chez l'homme.

La deuxième famille est celle des *Acholeplasmataceae* qui ne comprend que le genre *Acholeplasma*.

Enfin, la troisième famille est celle des *Spiroplasmataceae* qui contient 3 genres : les *Spiroplasma*, les *Anaeroplasma* et les *Thermoplasma*. Les *Spiroplasma* sont des anaérobies stricts du rumen des bovins et des ovins. Certains sont des organismes colonisant le tube digestifs des insectes et peuvent également être retrouvés dans l'hémolymphe ou occasionnellement dans d'autres organes tels que les glandes salivaires. C'est aussi parmi les *Spiroplasma* que l'on trouve les mycoplasmes du groupe « mycoïdes », auquel appartiennent des agents de l'agalactie contagieuse tels que *Mycoplasma mycoïdes capri* ou *Mycoplasma capricolum capricolum*. Les *Thermoplasma* sont thermophiles, leur température de croissance optimale est de 59°C ; ils sont acidophiles avec un pH optimum entre 1 et 2.

Toutes les espèces de mollicutes, à l'exception des *Thermoplasma* qui ont un mode de vie libre, sont parasites ou commensales de l'homme, des animaux, des insectes et des plantes et certaines espèces peuvent être pathogènes chez leurs hôtes.

En conclusion, la taxonomie et la phylogénie des mycoplasmes est extrêmement complexe et évolue à mesure que les découvertes scientifiques avancent, particulièrement concernant la génétique des différentes espèces.

1.3- Morphologie et structure

La structure des mycoplasmes, extrêmement simple, est celle d'une cellule sans paroi ni structure membranaire interne qui comprend un noyau procaryotique, un cytoplasme rempli de granulations, de ribosomes et d'une membrane plasmique trilamellaire de structure classique. Cette absence de paroi est à l'origine de leurs propriétés les plus frappantes : instabilité morphologique, sensibilité osmotique, sensibilité aux alcools et aux détergents, absence de coloration de Gram, résistance aux β -lactamines (pénicillines et céphalosporines)... En outre, la membrane cytoplasmique des mollicutes contient beaucoup plus de lipoprotéines membranaires que celle des autres bactéries. Par exemple, *Acholeplasma laidlawii* possède environ trois fois plus de lipoprotéines membranaires que *Lactobacillus lactis* ou *Bacillus subtilis*. Ces lipoprotéines constituent la majeure partie des antigènes dominants et certaines font l'objet de variations de taille et d'expression. Leur immunogénicité est souvent forte. [33].

Les mycoplasmes sont des cellules de petite taille, de grande plasticité (d'où leur aptitude à traverser les filtres) et d'une relative fragilité. Elles peuvent être sphérique ou globuleuses avec un diamètre de 0,125 à 0,250 μm ou allongées et filamenteuses avec un

diamètre uniforme et pouvant dépasser 100 μm de long. Bien que la plupart des espèces soient immobiles et dépourvues de flagelle, certaines espèces pathogènes comme *M. pneumoniae*, *M. genitalum*, *M. pulmonis*, *M. gallisepticum* sont mobiles par glissement. Elles possèdent une structure spécialisée en forme de protubérance qui leur permettrait d'adhérer à la cellule hôte et qui serait aussi impliquée dans le glissement.

Les capacités de biosynthèse des mycoplasmes sont limitées, c'est pourquoi ils sont très dépendants de leur hôte pour leur développement. Cela explique également la relative difficulté (variable en fonction des espèces) de leur culture en laboratoire. Les mycoplasmes sont par exemple incapables de réguler la fluidité de leur membrane par la biosynthèse d'acides gras. Ils surmontent cette difficulté en incorporant de grandes quantités de cholestérol exogène dans leur membrane, permettant de créer une stabilité osmotique et ainsi de survivre dans les conditions physiologiques normales.

Leur mode de division fait l'objet de descriptions contradictoires et reste à l'heure actuelle mal connu.

1.4- Physiologie et écologie

La culture et l'isolement des mycoplasmes sont laborieux. La plupart d'entre eux ont des exigences strictes et se développent sur des milieux complexes, riches, additionnés d'une forte concentration de sérum. Ce ne sont pas des parasites cellulaires stricts comme les Rickettses ou les Chlamidies. Ils sont anaérobies facultatifs, mais se multiplient de façon plus favorable en aérobiose. Sur les milieux solides, ils forment des colonies typiques en « œufs fris » ou « œufs au plat » avec une zone centrale opaque, granulaire, incrustée dans la gélose et une zone périphérique étendue transparente et dont le diamètre, généralement compris entre 10 et 600 μm , peut atteindre plusieurs mm.

Les Mycoplasmes possèdent les enzymes nécessaires à leurs propres synthèses et à la formation de liaisons à haut potentiel énergétique. Ils peuvent dégrader une grande variété de sucres et d'acides aminés dont la recherche était utile voire essentielle à l'identification des espèces : la fermentation du glucose par la voie glycolytique homolactique ou hétérolactique ; la dégradation de l'arginine par le système arginine-dihydrolase, l'hydrolyse de l'urée caractéristique des Mycoplasmes T (tiny) formant de minuscules colonies. Les composés lipidiques et protéiniques du sérum sont indispensables à leur croissance. Le cholestérol est un constituant important de leur membrane. Sa présence est exceptionnelle chez des bactéries capables de synthétiser des composés stéroliques. Dans le cas des mycoplasmes, le

cholestérol est fournit par le sérum qui est toujours ajouté dans les milieux de culture ; il est un facteur indispensable à la croissance de la majorité des espèces.

Les mycoplasmes sont très largement répandus en tant que commensaux ou parasites de plantes, d'arthropodes, d'animaux et de l'homme. En tant que formes libres, ils sont très largement répandus chez l'homme dans les cavités buccales, rhinopharyngées, le tractus génito-urinaire, les liquides pleuraux et articulaires. Leur pouvoir pathogène dans ces différentes sphères est largement controversé. Ils contaminent d'ailleurs fréquemment les cultures entretenues au laboratoire. Les mycoplasmes parasites des animaux ont quant à eux une prédilection pour les voies respiratoires, urogénitales, les glandes mammaires et les séreuses (en particulier articulaires). Ils sont souvent adaptés à une espèce-hôte chez laquelle ils sont pathogènes, mais peuvent coloniser d'autres espèces de façon plus silencieuse. Leurs exigences nutritionnelles les condamnent vraisemblablement, dans certains cas, à un parasitisme cellulaire étroit qui est permis par leurs propriétés d'attachement à la surface de nombreuses cellules épithéliales, érythrocytaires, spermatiques, au niveau des sites d'absorptions lipoprotéiques. Cette adhésion est nécessaire à la colonisation et à l'infection.

Les mycoplasmes apparaissent donc comme partiellement ou largement hôte-dépendants en fonction des espèces. Ce sont des parasites extracellulaires mais quelques études tendent à montrer que certaines souches pourraient, dans des conditions particulières, être des parasites intracellulaires (notamment *M. fermentans* et de *M. penetrans* chez les individus atteints du VIH). Cette question a reçu peu de réponses satisfaisantes pour *M. agalactiae*.

1.5- Génome, composition en bases et information génétique

La taille du génome des mycoplasmes est réduite : elle varie de 580 kpb pour *M. genitalium* (plus petit génome cellulaire connu) à 1380 kpb pour *M. mycoides mycoides* Large Colony. Cela correspond à environ 600 à 800 gènes. Des génomes aussi petits pourraient représenter le minimum pour une vie indépendante. A titre de comparaison, la taille du génome d'*Escherichia coli* est de 4640 kb.

Les mycoplasmes et les uréaplasmes, considérés phylogénétiquement comme les mollicutes les plus récents, possèdent un génome plus petit que les acholéplasmes et les spiroplasmes (la taille maximum étant de 2200 kb pour *Spiroplasma ixodetis*). L'évolution s'est donc probablement faite par réduction de la taille du génome et perte de gènes, les premiers gènes perdus comprenant ceux nécessaires à la synthèse de la paroi bactérienne [33].

L'ADN mycoplasmique est très pauvre en base G + C (Guanine + Cytosine) en comparaison des autres espèces bactériennes. En effet, le pourcentage de G + C du génome mycoplasmique est compris entre 18 et 40 % (avec une majeure partie entre 24 et 33%). A titre de comparaison le génome d'*E. coli* en contient 50 %. Les régions intergéniques possèdent une plus grande proportion de bases A + T (Adénine + Thymine) (pouvant atteindre 90%) que les régions codantes.

La proportion de bases G + C est importante à prendre en compte pour déterminer la température d'hybridation car une plus faible proportion de bases G + C implique une baisse de la température d'hybridation.

Le génome de *Mycoplasma agalactiae* est d'environ 945 kpb et contient de 30,5 à 34,2 % de G + C.

Les mycoplasmes partagent très peu de leur séquence nucléotidique avec les autres bactéries : ils sont caractérisés par l'usage d'un code non universel, c'est-à-dire que leurs codons ne sont pas les mêmes que ceux des autres bactéries. Cette particularité a occasionné des difficultés à faire s'exprimer les gènes des mycoplasmes alors qu'il n'est pas difficile d'isoler et de cloner des séquences génétiques d'*E. coli*. Le codon UGA, codon tryptophane chez les mollicutes phylogénétiquement récents tels que *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Mesoplasma* et *Spiroplasma*, est en effet le codon stop dans le code universel.

M. genitalium (580 kpb) et *M. pneumoniae* (816 kpb) sont considérés comme des «cellules minimales», ils ont été utilisés comme organismes modèles lors des premiers programmes de séquençage complet du génome des mollicutes. Après séquençage complet et comparaison des génomes, il apparaît que le nombre de régions codantes dans le génome de *M. genitalium* est de seulement 479, contre 677 chez *M. pneumoniae* et 4288 chez *E. coli*.

L'information génétique des mycoplasmes est réduite et sélective : les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivants capables de s'auto-reproduire sans avoir recours aux cellules de l'hôte. La comparaison des séquences de *M. genitalium*, *M. pneumoniae* et *E. coli* indique que les mycoplasmes ont perdu au cours de leur évolution la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés. Ils ont besoin de se trouver en présence de la totalité des acides aminés requis, que ce soit dans l'hôte ou dans le milieu de culture artificiel. Les mycoplasmes ont aussi perdu beaucoup de gènes impliqués dans la synthèse des cofacteurs enzymatiques. Ils ont donc un comportement de parasite vis-à-vis de leur hôte.

Le génome des mycoplasmes est variable au sein des souches d'une même espèce. Par exemple, la taille du génome de différentes souches d'*Ureaplasma urealyticum* varie de 760 à 1140 kpb [10]. Une des raisons de cette variabilité de taille est la présence fréquente, en nombre variable, d'éléments répétés qui consistent souvent en des fragments de gènes codant pour des protéines différant en taille et en nombre, ou en des séquences d'insertion [32]. Cette variabilité de la taille du génome à l'intérieur d'une espèce peut aussi être la conséquence de l'intégration de séquences virales dans le chromosome, comme cela a été démontré chez *Spiroplasma citri* où ces séquences peuvent représenter jusqu'à 1/12^{ème} du génome entier [32, 33]. Ces variations de taille sont aussi décrites chez *M. agalactiae*. Ces variations de taille du génome montrent la grande plasticité du génome des mycoplasmes, qui subit de fréquents réarrangements : insertions, délétions et inversions de gènes ou de segments du génome. Les importants réarrangements d'ADN observés chez certaines espèces situent le chromosome mycoplasmiq ue parmi les génomes les plus dynamiques et les plus variables connus [31, 34, 38].

Les recombinaisons génétiques peuvent être réparties en trois catégories selon le mécanisme impliqué : les recombinaisons homologues, site-spécifiques et illégitimes.

Les recombinaisons homologues ont lieu entre deux séquences présentant une homologie sur une longueur importante et sont possibles grâce à la protéine RecA qui joue un rôle prépondérant. Les recombinaisons homologues peuvent avoir lieu entre des éléments répétés dans le génome des mycoplasmes.

Les recombinaisons site-spécifiques concernent des séquences d'ADN spécifiques, reconnues et liées par une recombinase qui effectue des échanges de brins, des clivages et des ligations. Les séquences d'insertion, les transposons et les génomes des phages lysogéniques utilisent ce mécanisme pour s'insérer dans des sites du génome des mycoplasmes. Toutes les séquences d'insertion découvertes chez les mycoplasmes présentent un pourcentage élevé de bases A + T et utilisent le codon UGA comme codon tryptophane, ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'acquisitions récentes chez les mycoplasmes par transfert horizontal avec d'autres genres bactériens.

Enfin, les recombinaisons illégitimes ont lieu entre des séquences présentant peu ou pas d'homologie. Cela peut avoir lieu à la suite d'erreurs d'enzymes capables de cliver et de relier l'ADN comme les nucléases et les topoisomérases, ou à la suite d'erreurs lors de la réplication. Les séquences répétées en tandem sont susceptibles de s'étendre ou de se contracter à la suite de mésappariements de type « strand slippage » (glissement de brin) [38].

1.6- Facteurs de virulence et pathogénicité

Beaucoup de mycoplasmes ont été isolés chez l'Homme et l'animal. Cependant, ils sont souvent considérés comme des bactéries opportunistes ou peu pathogènes et pour bon nombre d'entre eux, leur implication causale directe dans le développement d'une maladie reste à démontrer. Outre l'existence d'espèces commensales (*M. salivarium*, *M. orale*, *M. bovirhinis*...), l'ambiguïté du pouvoir pathogène de nombreux mycoplasmes est probablement liée à la symptomatologie polymorphe et inconstante des infections mycoplasmaïques. Cependant, les maladies induites par certains donnent lieu à de graves problèmes de santé publique et leurs impacts économiques en santé animale sont loin d'être négligeables. Il s'agit généralement de maladies chroniques, à faible mortalité, malgré une forte morbidité.

La virulence est l'aptitude d'un agent pathogène à se multiplier dans un organisme vivant et à y entraîner des manifestations morbides. Cela ne présume nullement de la gravité de l'affection (éventuellement) engendrée. La virulence est donc la capacité d'un organisme à passer au dessus des défenses immunitaires de son hôte et à causer une maladie. Compte tenu de la très grande diversité existant chez les mycoplasmes, le sujet de la virulence pourrait être traité indépendamment pour chaque espèce. En effet, il semble bien établi que la virulence varie entre et au sein même des espèces. Cependant certaines caractéristiques communes peuvent être dégagées.

Beaucoup de mycoplasmes ont la faculté d'envahir le système sanguin. L'invasion sanguine démarre souvent à partir d'une infection locale mais, chez les animaux sains et chez les animaux immunisés, cette infection est rapidement endiguée par le système immunitaire. Les circonstances exactes permettant la traversée de la barrière épithéliale ne sont pas parfaitement connues, mais les expériences suggèrent que la maladie, résultat de l'invasion, est reliée à une diminution de la résistance de l'hôte (maladies intercurrentes par exemple) ou à une réponse immunitaire immature. Ainsi, chez les souris sans lymphocytes T exposées de façon intra-nasale à *M. pulmonis*, les mycoplasmes sont plus souvent présents dans d'autres tissus que le poumon que chez les souris normales. *M. mycoides mycoides* SC (small colonies) produit un polymère qui semble, au moins chez les veaux, moduler la fonction immunitaire et ainsi promouvoir la dissémination de l'infection pulmonaire primitive.

1.6.1- Adhésion

La plupart des mycoplasmes adhère fortement aux épithéliums respiratoire, urogénital, digestif ou mammaire. L'adhésion des mycoplasmes aux cellules hôtes permet ensuite la

colonisation et l'infection. Cette adhésion nécessite des mécanismes d'attachement. Les réactions de cytoadhésion et de cytoagglutination constituent habituellement *in vitro* des modèles pour l'étude des mécanismes d'attachement. De plus, il est possible d'étudier l'attachement des bactéries à des échantillons d'épithélium du site naturel d'infection. Ces types d'études ont montré que l'adhésion est médiée par des protéines parfois conjuguée. Il semble que certains mycoplasmes n'aient pas de structures particulières connues pour l'attachement, mais certains possèdent des adhésines concentrées sur une pointe appelée « tip ». Les adhésines (composants membranaires responsables de l'adhésion) les mieux connues sont celles de *M. pneumoniae* et de *M. genitalium*. L'espèce *M. pneumoniae*, agent de pneumonies (maladie d'Eaton) dans l'espèce humaine, possède plusieurs protéines impliquées dans l'attachement, dont la plus importante est la protéine P1 (masse moléculaire de 170 kDa). Des anticorps dirigés contre cette protéine inhibent l'attachement et la pathogénicité dans le modèle de la pneumonie chez le hamster. Des séquences homologues du gène P1 ont été trouvées chez *M. gallisepticum* et *M. genitalium*, suggérant l'existence d'un gène ancestral d'adhésine commun. Les récepteurs des adhésines sont des glycolipides sulfatés et des sialoglycoconjugués [1]. Cependant, bien que les adhésines soient les principales molécules impliquées, l'adhésion est un processus multifactoriel impliquant un certain nombre de protéines membranaires accessoires agissant de concert avec les éléments du cytosquelette pour faciliter la localisation des adhésines vers un pôle de la cellule [32, 33, 35].

Autrefois, les mycoplasmes étaient supposés être des bactéries exclusivement extracellulaires qui restaient attachées à la surface des cellules épithéliales. Mais il a été démontré que certaines espèces de mycoplasmes pathogènes sont capables de pénétrer dans les cellules hôtes non phagocytaires. Cette capacité d'invasion et de survie à l'intérieur des cellules hôtes a été très étudiée chez *M. penetrans*, mycoplasme isolé des voies génitales de patients atteints du SIDA [16, 1]. C'est aussi le cas de *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. gallisepticum* et *M. fermentans*. L'invasion cellulaire est un processus complexe qui implique habituellement une interaction spécifique entre une adhésine ou invasine bactérienne et un récepteur cellulaire. Il semble que les protéines de surface impliquées dans l'adhésion aient une implication dans l'invasion. Cela étant insuffisant pour expliquer la pénétration, des études ont montré en plus l'intervention du cytosquelette des mycoplasmes et l'existence de mécanismes de subversion du cytosquelette de la cellule hôte [16]. Le contact étroit entre les mycoplasmes (dépourvus de paroi) et la membrane plasmique des cellules hôtes pourrait provoquer une fusion localisée, éventuellement transitoire, entre ces deux types de membranes, ou pourrait induire l'échange de composants membranaires et « l'injection »

directe du contenu cytoplasmique des mycoplasmes, incluant les enzymes hydrolytiques, dans le cytoplasme des cellules hôtes [32, 35].

1.6.2- Dommages cellulaires directs : toxines et produits du métabolisme

La synthèse de toxine à proprement parler par les mycoplasmes a longtemps été ignorée. En effet, aucun produit présentant des homologies avec d'autres toxines bactériennes connues n'avait été identifié. Il était donc supposé que les dommages cellulaires étaient principalement dus à l'exacerbation de la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, les lipoprotéines membranaires de plusieurs mycoplasmes pathogènes sont supposées être des facteurs de virulence étant donné leur capacité à induire la production de cytokines pro-inflammatoires *in vitro*. Cette endotoxicité est d'abord médiée par des IL1, des TNF et des IL6 libérés par des cellules mononuclées CD14+. Beaucoup de mycoplasmes peuvent induire un ou plusieurs de ces médiateurs, mais les molécules impliquées ne sont pas toujours connues [1, 2].

Cependant, à l'heure actuelle, des produits mycoplasmiens proches de toxines connues ont été mis en évidence chez certains mycoplasmes.

Tout d'abord, des agents de nécrose digérant les tissus ont été mis en évidence chez *M. alligatoris*, mycoplasme atypique qui provoque une infection aiguë, pouvant entraîner la mort d'un alligator en moins d'une semaine. Il s'agirait d'une hyaluronidase (NagH) associée à une sialidase (NanI), toutes deux très proches de protéines sécrétées par *Clostridium perfringens* mais qui seraient cytosoliques chez *M. alligatoris* [16].

Ensuite, plus récemment, un facteur de virulence nommé CARDS TX, pour *community acquired respiratory distress syndrom toxin*, été étudié chez *M. pneumoniae* et chez *M. penetrans*. Ce produit mycoplasmiens présente des homologies avec des toxines bactériennes et associe une activité ADP-ribosyltransférase à un effet de vacuolisation des cellules chez les bactéries [16].

De plus, certains intermédiaires du métabolisme, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou les radicaux superoxydes, sont des facteurs de virulence potentiels.

Bien que le rôle de H₂O₂ dans la virulence n'ait pas été établi *in vivo*, une hypothèse est qu'il pourrait provoquer des dommages au niveau de la membrane plasmique des cellules

de l'hôte et inactiver ses catalases. [33]. Une étude montre que l'oxydation de NADH par différentes souches de *M. agalactiae* et *M. bovis* donne une production d'H₂O₂ variable suivant les souches : 0-1,21 mol/mol d'O₂ utilisé. De plus, des passages en culture successifs de *M. bovis* (souche 119B96) ont permis d'obtenir une diminution de la quantité d'H₂O₂ produite avec les valeurs suivantes : 0,52 ; 0,16 et 0,07 mol/mol d'O₂ consommé pour respectivement 50, 100 et 200 passages. Cette étude a également montré que la perte progressive de capacité à produire H₂O₂ était corrélée avec la perte d'une protéine de 32 kDa après 50 passages [2]. En outre, l'ammoniac produit dans le microenvironnement des mycoplasmes pourrait avoir des effets délétères sur les cellules cibles. Les modalités de cytotoxicité sont néanmoins variables d'un organisme à l'autre. Par exemple, *Ureaplasma diversum*, associé à de l'infertilité et des avortements chez les bovins, ne semble pas endommager les cils de l'oviducte pendant la colonisation, mais la fuite de calmoduline des cellules auxquelles ils adhèrent a un effet cytotoxique évident. [1]

Enfin, beaucoup des mycoplasmes qui causent des pneumonies adhèrent à l'épithélium ciliaire en induisant une stase, une perte de cils et des changements cytoplasmiques des cellules épithéliales. Cette cytotoxicité de contact serait liée non seulement à des peroxydations, mais aussi à la compétition pour les nutriments essentiels et aux effets des protéases, nucléases et lipases des mycoplasmes [1,2]

1.6.3- Effets mitotiques et apoptotiques, pouvoir oncogène ?

Des études *in vitro* ont démontré que des mycoplasmes pouvaient perturber le cycle cellulaire, que ce soit dans le sens d'une exacerbation ou d'une inhibition. Ainsi des effets inducteurs d'apoptose sont observés chez *M. bovis*, *M. hyorhinis*, *M. penetrans*, *M. alligatoris*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Au contraire, *M. fermentans* et *M. penetrans* ont des effets anti-apoptotiques via l'induction de NfκB ou l'inhibition de caspases. Des effets mitotiques ont été observés chez *M. arginini*, *M. arthritidis*, *M. fermentans* et *M. penetrans*. De plus, certaines infections à mycoplasme (*M. salivarium*, *M. orale*, *M. hominis* et *M. fermentans*) peuvent entraîner des aberrations chromosomiques et une instabilité génétique. Ceci peut conduire à des néoformations malignes *in vitro*, mais il n'est pas du tout certain qu'il en soit de même *in vivo* ; l'implication des mycoplasmes dans un quelconque cancer reste hypothétique [16].

1.6.4- Formation de biofilms

Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice extracellulaire adhésive et protectrice, le glycocalix, composé de polysaccharides [18]. Le biofilm est l'une des deux modalités de vie des organismes unicellulaires (l'autre mode de vie dit « planctoniques » étant la flottaison libre). Les bactéries vivant dans un biofilm subissent des adaptations génotypiques et phénotypiques qui leur confèrent des propriétés très différentes de celles des bactéries planctoniques de la même espèce. Elles sont en outre protégées de 4 manières. Premièrement, une protection passive est assurée par la matrice qui protège physiquement les bactéries contre les détergents et les antibiotiques. Deuxièmement, les bactéries sont protégées car elles sont moins actives métaboliquement, donc moins réceptives aux agents antimicrobiens. Troisièmement, la résistance aux antibiotiques de certains microorganismes comme *P. aeruginosa* a été attribuée à des pompes d'efflux du biofilm expulsant activement les composants antimicrobiens conférant ainsi une protection active. Enfin, l'environnement du biofilm est propice aux échanges de matériel génétique et permet le transfert de caractères de résistance, d'où une protection génétique. Ces biofilms peuvent se développer sur n'importe quel type de surface naturelle (débris cellulaires, séquestres) ou artificielle (prothèse, sonde, cathéter...) et sur des tissus vivants [20].

De nombreuses études réalisées en laboratoire ont montré que les bactéries attachées à une surface solide sont de 10 à 100 fois plus résistantes à l'action des désinfectants que les bactéries de la même souche en suspension. [19]. De plus, de nombreuses études ont montré que les biofilms étaient particulièrement résistants aux forces physiques (flux sanguin, appareil mucociliaire...), à la phagocytose et aux antibiotiques (y compris ceux auxquels les bactéries planctoniques sont sensibles) [20, 16].

Il a récemment été démontré que certaines souches de *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. putrefaciens*, *M. cottewii*, *M. yeatsii*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony et *M. pulmonis* sont capables de former des biofilms sur des surfaces inertes. Ceci pourrait expliquer la capacité de certains mycoplasmes à persister longtemps dans l'environnement, malgré l'absence de paroi. L'utilisation de ce mode de résistance *in vivo* reste à démontrer. Il est toutefois probable qu'il contribue à la persistance de l'infection chez l'hôte sous forme d'infections chroniques ou inapparentes. L'existence de biofilms pourrait aussi expliquer la très faible efficacité des antibiotiques contre les mycoplasmes [16].

1.7- La variabilité intraspécifique

La variabilité intraspécifique se caractérise par des différences antigéniques, génétiques, et protéiques entre souches ou isolats d'une même espèce [17].

1.7.1- Hétérogénéité génomique

L'analyse des profils de restriction de l'ADN chromosomique permet d'évaluer le degré d'hétérogénéité génomique des souches au sein d'une même espèce. L'importance de la variabilité génomique intraspécifique chez les mycoplasmes, abordée par cette méthode, dépend de l'espèce étudiée. *M. synoviae* et *M. pneumoniae* présentent un degré de variabilité limité, alors que les souches de *M. ovipneumoniae* sont très hétérogènes.

Chez *M. agalactiae*, une étude portant sur 33 souches a permis de déterminer un profil majeur regroupant 65 % des souches et plusieurs profils de restriction originaux, ce qui a mis en évidence une hétérogénéité génomique certaine chez cette espèce. De même, des tests d'hybridation ADN / ADN ont démontré l'existence d'une telle hétérogénéité au sein de *M. agalactiae* [17].

1.7.2- Hétérogénéité protéique

Chez les mycoplasmes, le degré de variabilité protéique évaluée en SDS-PAGE (Electrophorèse des protéines cellulaires en Gel de PolyAcrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate) unidimensionnelle présente une ampleur variable en fonction des espèces. *M. bovis* est une espèce relativement homogène ; en revanche, les souches de *M. capricolum* sp. *capricolum* et *M. agalactiae* sont plus hétérogènes de ce point de vue [17].

1.7.3- Hétérogénéité antigénique

La variabilité antigénique est la capacité que possède une souche donnée de modifier les propriétés des antigènes membranaires, pouvant ainsi éventuellement favoriser l'échappement au système immunitaire et la colonisation des tissus hôtes.

Chez les mycoplasmes, dépourvus de paroi cellulaire, c'est la membrane plasmique qui est en contact avec les composants du système immunitaire de l'hôte. Ceci les rend particulièrement sensibles à la lyse par les anticorps et le complément. Cependant, les infections par les mycoplasmes sont habituellement de nature chronique, ce qui montre la déficience fréquente des mécanismes de défense de l'hôte pour éliminer les mycoplasmes. Les

mycoplasmoses sont ainsi caractérisées, en général, par une morbidité élevée mais une mortalité faible au sein des troupeaux [3]. Ceci suggère que les mycoplasmes possèdent un ou plusieurs systèmes leur permettant d'échapper à la destruction par le système immunitaire de l'hôte. Il existe chez les mycoplasmes une forte instabilité antigénique au sein des générations issues d'un même clone. Cette instabilité résulte de modifications rapides, aléatoires et réversibles dans la distribution des protéines de surface, apparaissant avec une fréquence élevée de 10^{-2} à 10^{-3} par cellule et par génération. Ce phénomène, par sa fréquence, ne peut pas être attribué à de simples hasards de mutations (les fréquences des mutations normales vont de 10^{-6} à 10^{-8}) et suppose un déterminisme génétique original [31].

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypervariabilité antigénique ont été élucidés dans quelques espèces de mycoplasmes. Ces mécanismes mettent en général en jeu une famille de gènes multiples. A l'intérieur de cette famille de gènes, les événements qui concourent à la diversification phénotypique d'une population sont de différentes natures, selon l'espèce de mycoplasme considérée.

La plupart de ces antigènes hypervariables consistent en des lipoprotéines exposées à la surface des cellules et liées aux acides gras membranaires. Ces lipoprotéines sont capables de changer spontanément de phase, c'est à dire d'alterner l'expression et la non-expression de la protéine (expression de type ON / OFF). De plus, elles contiennent souvent des séquences répétées et peuvent varier spontanément en taille en changeant le nombre de ces répétitions.

En fonction de leur longueur, elles pourraient donc masquer ou démasquer d'autres antigènes de surface [32, 33].

De telles lipoprotéines ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces de mycoplasmes, dont les deux espèces phylogénétiquement proches, *M. agalactiae* et *M. bovis*.

M. bovis, pathogène des bovins, possède une famille de protéines, les Vsps (variable surface lipoproteins), dont l'expression et la taille varient de façon non coordonnée. Treize cadres de lecture ont été caractérisés sur une région génomique de 16 kb portant le locus *vsp*.

Environ 80 % des protéines de la famille des Vsps sont composées de séquences répétées de 6, 8, 10, 11, 12, 26, 84 ou 87 acides aminés. Des délétions ou des additions dans ces régions génèrent des variations de taille des protéines Vsps. Lors de recombinaisons de type site spécifique au sein du locus *vsp*, des séquences sont inversées ce qui produit le changement de phase ON / OFF en plaçant, ou non, un gène sous la dépendance d'un promoteur de transcription. Un autre mécanisme, original, permettant les variations d'expression de type

ON/OFF a été mis en évidence dans le gène *vspA* : l'insertion d'un élément génétique mobile en amont du site d'initiation de la transcription bloque la transcription et donc l'expression de la protéine [24, 33, 48].

Chez *M. agalactiae*, une famille de gènes multiples codant pour de nombreuses protéines de surface variables similaires aux Vsps de *M. bovis*, les Vpmas (Variable proteins of *M. agalactiae*), a été caractérisée dans la souche type PG2.

Les caractéristiques des Vpmas sont les suivantes : il existe 6 gènes *vpma* dans un locus d'environ 10 kb, les lipoprotéines Vpmas possèdent une séquence signal atypique et un site de clivage unique chez les procaryotes, toutes les Vpmas présentent une séquence aminotermale commune, des variations d'expression de type ON / OFF des Vpmas correspondent à des réarrangements d'ADN dans le locus des gènes *vpma*. En se basant sur la présence de régions 5' non traduites très conservées, des séquences signal et des séquences aminotermiales communes, il a été proposé que la famille des gènes *vpma* représente un système homologue à celui de la famille des gènes *vsp* de *M. bovis*. Les séquences répétées des Vpmas contiennent plus d'acides aminés que les Vsps : elles sont composées de 86, 91 ou 186 acides aminés, mais certaines répétitions sont tronquées [17, 19].

De plus les Vpmas ont en commun avec les Vsps de courtes séquences d'acides aminés impliquées dans l'adhésion de *M. bovis* aux cellules pulmonaires des bovins. Malgré la présence de courtes séquences identiques entre les Vsps et les Vpmas, les séquences codantes des gènes *vpma* et *vsp* sont peu homologues sur la majorité de leur longueur. Cela pourrait jouer un rôle dans la spécificité d'hôte différente entre ces deux espèces.

Une analyse des répertoires des gènes *vpma* de 33 souches de *M. agalactiae* d'origine et de pathogénicité variables a été réalisée par southern blot basé sur l'homologie affectant les régions 5' non traduites et les séquences signal. Cette étude [18] a permis de proposer une classification de ces souches selon la similarité de leur répertoire de gènes *vpma* avec celui de la souche PG2. Pour cela, la sonde A3F a été utilisée : cet oligonucléotide dégénéré s'hybride avec les séquences amino-terminales conservées présentes sur les 6 gènes *vpma*. La classification proposée est basée sur la présence ou l'absence de gènes *vpma* par rapport à la souche PG2, le poids moléculaire des bandes avec lesquelles la sonde A3F s'est hybridée, les éventuelles bandes supplémentaires détectées par cette sonde A3F, et la méthylation de l'ADN. Les southern blot ont montré que quasiment chacune de ces 33 souches possède un profil *vpma* qui lui est propre.

2- Le syndrome Agalactie contagieuse

2.1- Importance de l'agalactie contagieuse

Tout d'abord, son importance, au-delà de l'aspect médical (faible mortalité), réside dans sa très large distribution géographique, sa prévalence souvent élevée dans certains foyers où il est présent de manière enzootique et dans les pertes économiques et génétiques qu'il engendre [7]. La morbidité pouvant atteindre 30 à 60% dans certains cheptels, les pertes économiques occasionnées par les chutes de production, les avortements et la mortalité des agneaux ou des chevreaux peuvent être importantes. Dans les pays ou les régions où les produits laitiers et la viande de petits ruminants jouent un rôle important dans l'alimentation ou dans l'économie, l'agalactie contagieuse est un véritable problème. Ceci est particulièrement vrai dans certains pays en voie de développement. Le Mali par exemple est un pays d'élevage où les petits ruminants occupent une place de choix tant par leur nombre (15 380 000 têtes) que par leur apport au revenu du monde rural et à l'alimentation des enfants et des femmes dans les communautés rurales (lait et viande). L'élevage des petits ruminants reste cependant confronté à de nombreuses pathologies infectieuses parmi lesquelles les mycoplasmoses semblent occuper une place non négligeable avec une présence connue de *M.agalactiae*, *M. mycoides capri* et *M. capricolum capricolum* [14].

En Europe, le syndrome de l'agalactie contagieuse constitue l'affection mycoplasmaïque la plus fréquente et la plus grave chez les petits ruminants. Il compte parmi les dominantes pathologiques des troupeaux caprins français [16].

Enfin, l'agalactie contagieuse des petits ruminants est, comme nous l'avons indiqué précédemment, sur l'ancienne liste B de l'OIE. En France, l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* fait l'objet d'une lutte organisée dans trois départements (Savoie, Haute-Savoie et Pyrénées-Atlantiques) et est soumise à une réglementation. L'agalactie contagieuse à mycoplasmes du groupe « *mycoides* », n'est quant à elle soumise à aucune réglementation au niveau national [39].

2.2- Etiologie

L'agalactie contagieuse est un syndrome. Un syndrome désigne un ensemble de symptômes indépendamment de leur cause contrairement à une maladie pour laquelle un agent étiologique précis est identifié.

Ce syndrome est connu depuis environ 200 ans : il a été décrit pour la première fois en Italie en 1816 par Metaxa et c'est Brusasco qui lui a donné ce nom en 1871. Le premier agent historiquement décrit est *M. agalactiae* : il a été isolé en 1923 par Bridre et Donatien comme la deuxième espèce de mycoplasme connue. En 1931, il fut nommé *Anulomyces agalaxiae* par Wroblewski mais, en 1957, son nom fut changé en *Mycoplasma agalactiae* par Freundt en accord avec la nouvelle taxonomie des mycoplasmes [8].

M. agalactiae (*Ma*) a longtemps été considéré comme le seul agent étiologique de l'agalactie contagieuse mais, dans les années 1970 et 1980, des tableaux cliniques caprins assez proches ont été permis l'identification d'autres espèces : *M. mycoides capri* (*Mmc*) et *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*). Enfin, l'implication, plus rare, de *M. putrefaciens* (*Mp*) dans des foyers cliniquement similaires a été plus récemment démontrée. Les trois derniers mycoplasmes cités, apparentés au groupe "mycoides", peuvent être décrits comme les mycoplasmes du syndrome MAKePS. Aujourd'hui, le terme d'agalactie contagieuse désigne le syndrome causé par un ou plusieurs de ces quatre mycoplasmes [7]. Les ovins sont principalement atteints par *M. agalactiae* tandis que les caprins sont infectés par les quatre espèces. *M. agalactiae* représente une espèce phylogénétiquement éloignée du « groupe mycoides », auquel appartiennent *M. mycoides capri* et *M. capricolum* subsp. *capricolum*. Au sein de ce groupe, les différents mycoplasmes présentent une forte proximité génétique et antigénique. Suite à des travaux récents, des transferts horizontaux de gènes entre différents mycoplasmes pouvant coloniser les mêmes hôtes (oreille externe de la chèvre par exemple), au sein du groupe « mycoides » et avec *M. agalactiae*, sont fortement suspectés. Des protéines de surface communes pourraient donc exister, rendant plus difficile l'identification spécifique. C'est l'une des raisons pour lesquelles l'identification d'espèce reste délicate, et la taxonomie quelque peu complexe [7].

Tableau 5 : mycoplasmes impliqués dans le syndrome Agalactie Contagieuse, souches de référence, espèces cibles et formes cliniques courantes [9]

Espèce	Souche type	Espèces atteintes	Caractéristiques
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	PG-2	Ovins et caprins	Agent « classique » de la maladie
<i>Mycoplasma mycoides capri</i>	Y-goat	Caprins (+++) et ovins	Formes plus sévères, symptômes respiratoires fréquents
<i>Mycoplasma capricolum capricolum</i>	California kid	Caprins (+++) et ovins	Formes plus sévères, symptômes respiratoires fréquents
<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	KS-1	Caprins (ovins)	Rare, pas de symptômes oculaires décrits

M. agalactiae possède les caractéristiques typiques des mycoplasmes qui ont été précédemment décrites. Ce sont de petites cellules (124-250 nm) dépourvues de paroi avec un génome court (1×10^9 Da). Comme tous les mycoplasmes, ils sont résistants aux β -lactamines, mais sensibles au choc osmotique, à la digitonine et aux détergents : ils sont détruits en 15 à 20 minutes en présence de désinfectants utilisés aux concentrations classiques (chloramine, hydrochloride de potassium et formaline). Ils sont également sensibles aux rayonnements ultraviolets et aux augmentations de température : ils sont inactivés en 5 minutes à 60° et en 1 minute à 100°C. Ils survivent plus de 4 mois à 8°C, une à deux semaines à température ambiante et restent virulents 8 à 9 mois à -20°C. La culture de *M. agalactiae* nécessite des milieux solides ou liquides enrichis de stérols. Sa culture en milieu solide requiert une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et donne des colonies en « œufs au plat » typiques. Ils ne fermentent pas le glucose et n'hydrolysent ni l'arginine ni l'urée [8].

2.3- Tableaux cliniques

L'agalactie contagieuse présente un caractère protéiforme. Elle est classiquement caractérisée par une triade de symptômes mammaires, articulaires et oculaires, d'autres symptômes moins typiques étant possibles tels que des troubles respiratoires. Ces trois types de symptômes ne sont pas forcément simultanés sur un animal ou dans un troupeau donné [9]. L'évolution de ces tableaux dépend de la forme clinique en cours (aiguë à chronique), du statut immunitaire des animaux et des mesures de lutte instaurées : cela peut aller de la pleine récupération fonctionnelle à la perte de toute valeur économique ou à la mort [7]. L'incubation dure d'une semaine à deux mois en fonction de la virulence de l'agent infectieux et des résistances de l'hôte [8].

2.3.1- Agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* (Ma)

La maladie affecte les ovins et les caprins des deux sexes et peut prendre différentes formes.

2.3.1.1- Forme typique

La phase initiale, concomitante à la bactériémie, comporte en général un bref syndrome fébrile avec abattement, hyperthermie et inappétence.

La phase clinique a lieu lorsque les germes se localisent dans un ou plusieurs de leurs organes cibles.

Les symptômes mammaires, qui sont généralement les premiers observés, sont toujours présents sur les femelles en lactation malades. Celles-ci développent en effet une mammite, uni ou bilatérale, souvent accompagnée d'une augmentation des nœuds lymphatiques rétro mammaires. Des désordres fonctionnels allant d'une hypogalactie transitoire à une soudaine et totale agalactie sont également observés.

Les symptômes articulaires affectent surtout les jeunes ruminants et les caprins. Ils touchent souvent les articulations tarsiennes et carpiennes sous forme d'arthrites ou de polyarthrites de sévérité variable allant de la boiterie légère à l'ankylose et au décubitus.

Les symptômes oculaires peuvent toucher toutes les catégories d'animaux. Ils commencent par des conjonctivites qui évoluent en kératites parenchymateuses avec néo-vascularisation cornéenne. Ils peuvent atteindre un seul œil ou les deux.

Plus rarement, des avortements tardifs peuvent avoir lieu et des diarrhées sont parfois observées.

Tous les symptômes ne sont pas toujours tous présents au même moment sur un même individu. Même si le syndrome complet peut être observé au sein d'un troupeau, les animaux peuvent présenter individuellement des combinaisons variables des différents symptômes. Lorsque la maladie est enzootique, des formes incomplètes ou inapparentes peuvent exister.

L'évolution de la maladie dépend de la forme clinique dominante et des mesures hygiéniques et thérapeutiques mises en œuvre. Le pronostic dépend également de l'historique du troupeau infecté par rapport à la maladie. Ainsi, dans les zones enzootiques, des cas de guérison complète ont été rapportés. Au contraire, dans les troupeaux nouvellement infectés, le pronostic est beaucoup plus défavorable et la plupart des animaux perd sa valeur économique à cause de la sévérité des lésions occasionnées [10].

2.3.1.2- Formes atypiques

Ce sont essentiellement des formes exotiques à tropisme unique qui affectent principalement les caprins. Des pneumonies et pleuropneumonies ont été observées en Australie, en Inde et sporadiquement dans d'autres pays. Des vulvo-vaginites granuleuses existent en Inde et en Afrique [11].

2.3.1.3- Formes asymptomatiques

Certaines formes sont asymptomatiques dès l'apparition de l'infection contrairement aux formes classiques pour laquelle la sévérité de l'affection diminue avec le temps et les générations (en dehors des rechutes). Des souches de *Ma* ont été isolées dans le lait

d'élevages intensifs situés dans des zones où aucun cas d'agalactie contagieuse n'a été décrit et où les animaux ne présentaient aucun symptôme. Ces souches sont donc considérées comme avirulentes et font actuellement l'objet d'études [10].

2.3.1.4- La question de la faune sauvage

Entre 2001 et 2007, *Ma* a été isolé plusieurs fois à partir de poumons de bouquetins des Alpes (*Capra ibex ibex*), en Savoie. Ces bouquetins étaient atteints de pathologies pulmonaires atypiques et mortelles. L'analyse des souches isolées et leur comparaison avec des souches de *Ma* responsables d'agalactie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques et en Savoie, par électrophorèse en champ pulsé avec 3 enzymes de restriction différentes (SmaI, MluI et KpnI) a permis de démontrer plusieurs choses. Premièrement, ces souches sont très différentes des souches caprines locales historiques. Deuxièmement, elles sont différentes des souches nationales actuelles. Enfin, elles sont différentes entre elles. Ces souches sont donc impliquées dans une enzootie propre aux Bouquetins des Alpes, sans aucune relation avec l'agalactie contagieuse observée chez les petits ruminants domestiques [13].

2.3.2- Agalactie contagieuse à *Mycoplasma mycoides capri* (Mmc) :

Ce biotype affecte principalement les caprins, mais a aussi été isolé à partir d'ovins et de bovins [12]. Il est présent sur tous les continents y compris dans des zones où *Ma* n'est pas communément isolé. La symptomatologie est marquée par une plus forte variabilité que celle de *Ma*, liée à une grande diversité des organes-cibles et à des évolutions différentielles (septicémies mortelles à infections asymptomatiques) [8]. En outre, l'infection par *Mmc* conduit généralement à des lésions et des séquelles plus graves.

2.3.2.1- Chez les adultes

Comme pour *Ma*, les femelles peuvent présenter une mammite clinique avec chute de la production laitière. Des arthrites et des polyarthrites sont fréquentes chez les caprins, associées ou non à des symptômes mammaires. Des septicémies mortelles sont également décrites.

La différence essentielle entre *Ma* et *Mmc* réside dans la troisième localisation majeure de ce dernier, qui est pulmonaire. Des pneumonies ou des pleurésies primaires dues à *Mmc* existent seules ou associées à d'autres symptômes. Elles sont mortelles dans 60% des cas. Les symptômes oculaires, les avortements, les péritonites et les abcès localisés sont rares [10].

Des formes atypiques telles que des balanopostites et des vulvo-vaginites ulcératives isolées ont été décrites chez les ovins en Afrique et en Australie.

2.3.2.2- Chez les jeunes

Des affections aiguës et suraiguës conduisent à une mortalité néonatale considérable. Les signes locaux sont principalement des polyarthrites, des pneumonies et plus rarement des kératoconjunctivites et des diarrhées. Le système nerveux central peut aussi être atteint.

Le tableau clinique des infections expérimentales de petits ruminants avec *Mmc* par différentes voies d'inoculation est similaire à celui des infections naturelles.

2.3.3- Agalactie contagieuse à *Mycoplasma capricolum* subsp *capricolum* (*Mcc*):

Cette sous espèce affecte principalement les caprins, mais des cas cliniques ont été décrits chez des ovins et même très rarement chez des bovins et des caprins sauvages. Les deux caractéristiques différenciant *Mmc* de *Ma* s'appliquent aussi pour *M. capricolum* subsp. *capricolum* : la symptomatologie est variable et les syndromes occasionnés peuvent être hautement destructeurs (avec une incidence très élevée, en particulier chez les chevreaux).

2.3.3.1- Chez les adultes

Deux grands types de syndromes existent en phase clinique avec des formes intermédiaires possibles.

Le plus fréquent est un syndrome d'agalactie contagieuse classique plus ou moins complet dans lequel les signes articulaires (polyarthrites ou arthrites fibrinopurulentes) dominent. Les formes oculaires sont rares. Enfin, les adultes ne présentent que très rarement des symptômes respiratoires même si les infections asymptomatiques des voies respiratoires et des poumons sont relativement fréquentes.

Dans certains pays comme le Maroc, des tableaux dominés par une symptomatologie respiratoire peuvent être observés, en association avec des conjunctivites et/ou kératites chez les ovins et des arthrites et mammites chez les caprins.

Des avortements peuvent survenir en association avec ces différents syndromes [10].

Au Royaume-Uni, des lésions génitales ont été décrites lors d'un foyer à *Mcc*. Cette forme atypique correspond à des vulvo-vaginites et à des balanopostites isolées [12].

2.3.3.2- Chez les jeunes

Chez les chevreaux, l'atteinte est généralement extrêmement sévère et similaire à celle de *Mmm*LC. En général, un syndrome fébrile conduit à la mort en quelques jours ou en quelques heures. Les symptômes locaux, quand ils sont présents, touchent les articulations, les yeux, les poumons et le système nerveux central.

L'inoculation de *Mcc* donne des symptômes comparables à ceux de l'infection naturelle [10].

Enfin, il faut noter que des anticorps contre *Mmc* et *Mcc*, mais pas contre *M. agalactiae*, ont été détectés chez des camélidés d'Amérique du Sud, comprenant des lamas, des alpagas et des vigognes, mais sans isolement des mycoplasmes en cause (20). Ces camélidés sont affectés par des maladies évoquant les infections à mycoplasmes, incluant des polyarthrites et des pneumonies : il est probable que des mycoplasmes comme *Mmc* et *Mcc* pourront être identifiés dans le futur chez ces animaux [12].

2.3.4- Agalactie contagieuse à *Mycoplasma putrefaciens* (Mp)

Mp a très longtemps été considéré comme un agent de mammites contagieuses caprines peu graves qui pouvaient ne toucher qu'une héli-mamelle avec des signes locaux très discrets comparés à ceux de l'agalactie contagieuse classique. Cependant, en 1987, une épidémie très sévère aux USA a révélé le caractère invasif de *Mp* et sa capacité à causer des bactériémies [10]. Il a été ainsi associé à un important foyer de mammites et d'agalacties associées à des arthrites sévères chez les chèvres atteintes avec des avortements et de la mortalité (mais sans hyperthermie) en Californie, aux USA [12].

Actuellement, de nombreux cas (en Espagne notamment) soulignent le tropisme de *Mp* pour les articulations des chevreaux et des adultes, même si la localisation mammaire reste préférentielle [12]. Un tropisme respiratoire de *Mp* est suspecté car il a été isolé dans l'arbre bronchique et les poumons d'ovins et de caprins présentant des pneumonies. Aucun tropisme oculaire n'a été décrit.

L'injection diathélique de *Mp* à des chèvres en lactation provoque une agalactie de l'héli-mamelle inoculée sans autre symptôme. Les inoculations de caprins jeunes ou adultes par différentes voies n'ont pas occasionné de maladie clinique. En revanche, l'inoculation intra-nasale de *Mp* à des chevreaux débilités par des coccidies digestives conduit à une bactériémie et à des arthrites.

Mp peut donc être considéré comme un pathogène opportuniste capable de provoquer des infections intermédiaires en nature et en sévérité entre les mycoplasmoses primaires (causées par *Ma*, *Mmc* et *Mcc*) et les mycoplasmoses associées (*M. ovipneumoniae* par

exemple). *Mp* peut donc causer des signes cliniques, particulièrement lorsque la sensibilité des animaux est augmentée par des facteurs extérieurs comme des maladies intercurrentes, des facteurs de stress, des conditions défavorables...

2.4- Epidémiologie descriptive

2.4.1- Distribution géographique de l'agalactie contagieuse

L'agalactie contagieuse est une maladie réglementée notifiable à l'OIE. En théorie, sa présence devrait donc être rapportée annuellement par les différents pays : sa distribution géographique exacte et son évolution devraient donc être connues avec une grande précision. Cependant, c'est loin d'être le cas en pratique. Par exemple, entre 1996 et 2004, seuls 31 pays de quatre continents ont communiqué l'existence d'agalactie contagieuse sur leur territoire. Du point de vue officiel, l'Océanie serait donc le continent indemne et pourtant des études scientifiques rapportent des cas d'agalactie contagieuse en Australie et en Nouvelle Zélande. Les rapports officiels sous-estiment donc largement l'extension de la maladie [9].

Un autre exemple édifiant est celui de la Jordanie où aucun cas d'agalactie contagieuse n'a été rapporté (Tableau 6). Ceci paraît étonnant compte tenu de sa situation géographique. Une étude publiée en 2002 a démontré la présence de *Ma* dans ce pays [15].

L'agalactie contagieuse est présente sur tous les continents. En effet, des isolements d'au moins un de ses quatre agents étiologiques ont été réalisés dans au moins 55 pays et ce nombre est certainement très sous estimé compte tenu de l'absence de laboratoire spécifique pour le diagnostic des mycoplasmes dans de nombreux pays. *Mmc* possède la répartition géographique la plus large parmi les mycoplasmes des ruminants [12].

La partie du monde dans laquelle la maladie a la plus large distribution et les meilleures descriptions est le bassin méditerranéen. En plus des 14 pays bordant la méditerranée, elle a aussi affecté ou affecte encore les pays européens suivants : le Portugal, l'Autriche, la Roumanie, la Bulgarie, la communauté des états indépendants, L'Allemagne, la Suède, et le Royaume Uni. Dans ces trois derniers pays, seuls des épisodes sporadiques ont été rapportés [10].

Tableau 6 : cas d'agalactie contagieuse rapports dans les pays méditerranéens entre 1965 et 2004 [9]

Pays	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Albanie	+0	+	+	+	+				
Algérie	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bosnie Herzégovine	0					-		-	
Bulgarie	+	+	+	+	+	2000	2000	2000	2000
Croatie	+	?	?	-	-	-		-	
Cyprus	0	0	0	0	0	0	0	0	
Egypte	0	0	0	0	0	0	0	0	
Macédoine	...	-		0	0	+	+	+	+
France	+	+	+0	+0	+0	+0	+0	+0	
Georgie	...				1965	1965	1965	1965	1965
Grèce	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Israël	+	+0	+0	+0	+0	+0	+0	+0	
Italie	+	+	+	+	+	+	+	+	2003
Jordanie	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lebanon	+	+	+0	+0	1999	1999	1999	1999	
Lybie		-	-	-	-	-	-	-	
Malte	-	1988	1988	1988		1988	1988	1988	
Moldavie	1995	+0	1997	1997	1997	1997	1997	1997	
Maroc	-	-	-	-	-	
Palestine								+	+
Portugal	+	+	+	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Roumanie	+0	+0	+0	+0	+0	+0	+0	+0	
Russie	-	-	-						
Serbie et Monténégro	
Syrie				-	-	-	-	-	-
Slovénie	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espagne	+	+	+	+	+	+	+	+	
Tunisie	+	1996	1996	1996	1996	1996	1996	1996	1996
Turquie	+	1996	1996	1996	1996	1996	1996	1996	1996
Ukraine	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(Source: http://www.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c=cont=6&c_mald=50); 0, maladie jamais décrite dans ce pays; -, pas de cas de maladie rapporté (date du dernier épisode inconnue); année, date du dernier cas de maladie rapporté ces dernières années; ?, maladie suspectée mais présence de mycoplasmes non confirmée; +, rapporté ou connu comme étant présent; +?, identification d'un agent causal de l'agalactie contagieuse par sérologie ou bactériologie, mais aucun signe clinique de maladie; (), maladie circonscrite à certaines zones spécifiques; . . . , aucune information disponible.

En Afrique, en plus des pays du Maghreb, des épizooties ont été rapportées dans les pays suivants : Mauritanie, Sénégal, Guinée, Guinée Bissau, Togo, Côte d'Ivoire, Ghana, Nigéria, Cameroun, Niger, Tchad, Soudan, Ethiopie, Kenya, Mozambique et Zimbabwe [10]. Cependant cette liste n'est certainement pas exhaustive, la situation épidémiologique étant

méconnue dans de nombreux pays dont certains réalisent des échanges de bêtes avec des pays contaminés. Ainsi, une étude récente s'est intéressée à la prévalence de l'agalactie contagieuse à *Ma* au Mali (officiellement indemne) qui importe beaucoup de petits ruminants du Sénégal et de Mauritanie (cités dans la liste ci-dessus). La recherche par ELISA d'anticorps anti *Ma* sur le sérum de 396 petits ruminants de différentes régions maliennes (77 ovins et 319 caprins) a révélé une séroprévalence moyenne de 8,3%. Celle-ci représenterait réellement des infections car la vaccination contre l'agalactie contagieuse est interdite au Mali. De plus, les troupeaux ayant un historique de troubles respiratoires ou de la production laitière présentaient une prévalence beaucoup plus élevée (60,6%) [14].

Sur le continent asiatique, la maladie est présente en Asie mineure, en Irak, aux Emirats Arabes Unis, en Iran, en Afghanistan, au Pakistan, en Inde, au Népal, en Chine, en Mongole et en Indonésie.

La situation épidémiologique des continents Nord et Sud américains est moins bien connue. L'agalactie contagieuse est présente aux Etats-Unis d'Amérique (USA) depuis 1950. Des cas cliniques ont été réécrits au Canada, en Guadeloupe, au Pérou et au Brésil.

Enfin, la maladie est présente en Australie et en Nouvelle Zélande.

2.4.2- Distribution géographique des différentes mycoplasmoses

Dans la plupart des pays méditerranéens (sauf le Maghreb) et dans l'ouest de l'Asie, on remarque la présence prépondérante de *Ma* qui est responsable d'une forme généralement enzootique de la maladie. De façon générale, les ovins sont principalement infectés par *Ma* et les caprins par *Mmc* et/ou *Mcc*. Cependant, dans cette partie du monde (et notamment en Espagne, Portugal, France, Italie, Israël, Irak, Iran...), des foyers anciens d'infection de caprins à *Ma* persistent. En Europe et dans le bassin méditerranéen, des infections à *Mmc* sont observées sous forme sporadique généralement. *Mcc* est aussi présent dans ces pays, particulièrement en Algérie et au Maroc de façon enzootique sur les chèvres mais aussi fréquemment sur des moutons. Des cas cliniques de *Mp* ont été rapportés en Espagne et en Egypte.

Aux USA et en Australie, la situation épidémiologique est différente. Les quatre mycoplasmes ont été isolés sur des caprins dès les années 50 sans qu'aucune description de forme clinique prépondérante ne soit faite. *Mmc* semble être l'agent le plus présent. Depuis la première description de *Mp* en Californie en 1955, cette infection est apparemment demeurée limitée en fréquence et en extension. Seuls des cas cliniques sporadiques ou des isolements de *Mp* ont été observés même si sa séroprévalence atteint 11% en Californie. Son portage auriculaire a été démontré en Australie.

La présence de *Ma*, *Mmc* et *Mcc* a été démontrée en Afrique et en Inde.

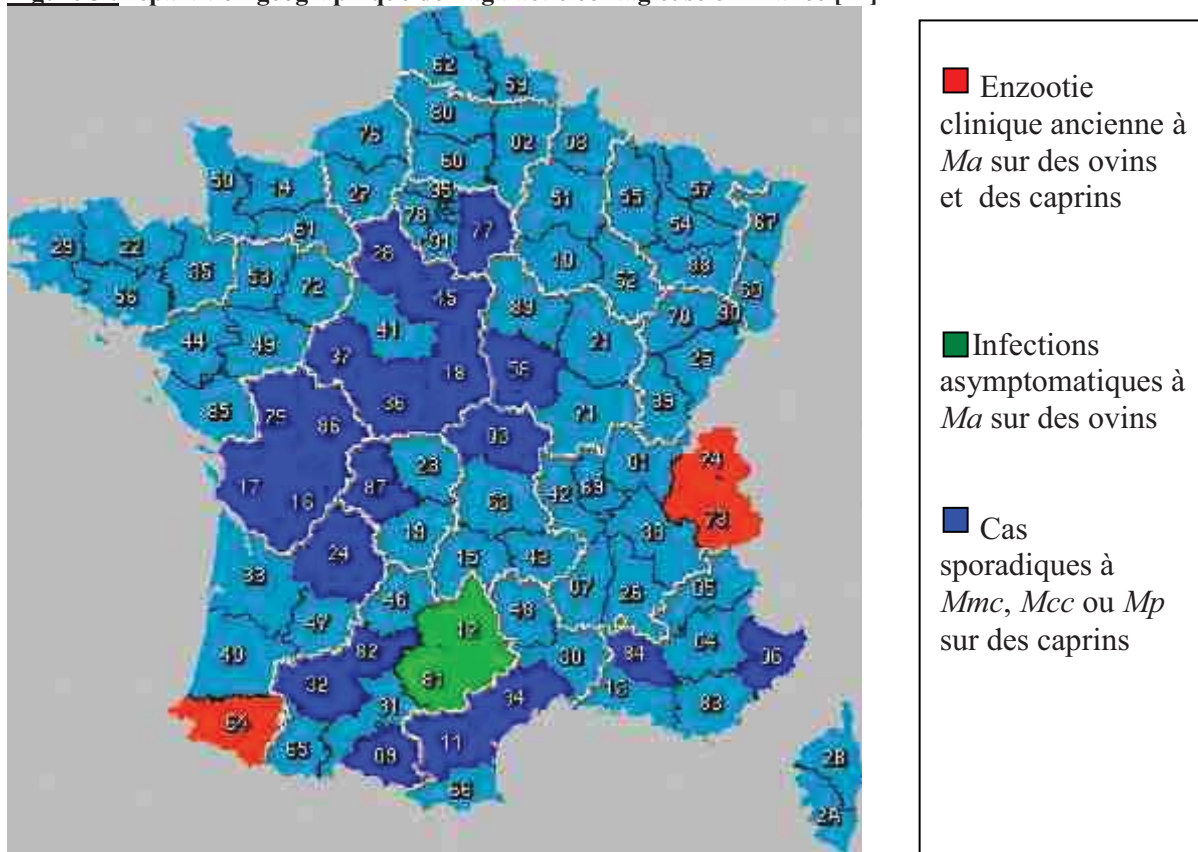
Tableau 7 : caractéristiques étiologiques et épidémiologiques de l'agalactie contagieuse dans plusieurs pays [10]

Pays	Mycoplasme	Extension géographique	Forme épidémiologique	Espèce hôte
France	<i>Ma</i>	()	E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>) (S	Caprins
	<i>Mcc</i>) (S	Caprins, (ovins)
	<i>Mp</i>) ([S]	Caprins
Espagne	<i>Ma</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>) (S	Caprins, (ovins)
	<i>Mcc</i>) ([S]	Caprins, (ovins)
	<i>Mp</i>) ([S]	Caprins, (ovins)
Portugal	<i>Ma</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>) (S	Caprins
	<i>Mcc</i>) (S	Caprins
Suisse	<i>Ma</i>	()	E	Caprins, (ovins)
Italie	<i>Ma</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>	()	S	Caprins, (ovins)
	<i>Mcc</i>	()	E ou S	Caprins, (ovins)
Grèce	<i>Ma</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>	?	S	Caprins
	<i>Mcc</i>	?	S	Caprins
Turquie	<i>Ma</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>	?	?	Caprins
	<i>Mcc</i>	?	?	Caprins
Israël	<i>Ma</i>	()	E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>	()	S	Caprins
Iran	<i>Ma</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Mmc</i>	?	?	Caprins
Maroc	<i>Mcc</i>) (E	Ovins, caprins
	<i>Ma</i>) (E	Caprins, ovins
USA	<i>Mmc</i>) (E	Caprins
	<i>Mcc</i>	()	S	Caprins, (ovins)
	<i>Mp</i>	()	S	Caprins
	<i>Ma</i>	()	S	Caprins
Australie	<i>Mmc</i>	?	?	Caprins
	<i>Ma</i>	?	?	Caprins
	<i>Mcc</i>	?	?	Caprins
	<i>Mp</i>	?	?	Caprins

Ma : *Mycoplasma agalactiae* ; *Mmc* : *Mycoplasma mycoides capri* ; *Mcc* : *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum* ; *Mp* : *Mycoplasma putrefaciens* ; () : maladie confinée à certaines régions ;) (: large distribution de la maladie ou distribution inconnue ; E : enzootique ; S : cas sporadiques ; [S] : cas sporadiques exceptionnels ; ? : pas de données

En France, *Ma* était l'agent de l'agalactie contagieuse enzootique clinique dans trois départements (Pyrénées-Atlantiques, Savoie et Haute Savoie). Il a également été isolé à partir de lait de tank dans le Tarn et l'Aveyron mais sans que les brebis Lacaunes ne présentent de signe clinique. *Mmc*, *Mcc* et *Mp* occasionnent des cas cliniques sporadiques chez les caprins dans la quasi-totalité des départements.

Figure 3 : répartition géographique de l'agalactie contagieuse en France [11]



En conclusion, la coexistence de plusieurs mycoplasmes responsables de l'agalactie contagieuse n'est pas exceptionnelle chez les caprins. Cette coexistence peut exister dans une région, dans un troupeau et même au sein d'un animal. *Mmc* et *Ma* sont les plus fréquemment impliqués. *Ma* est l'agent causal dominant chez les ovins, le plus souvent sous forme enzootique, mais aussi ponctuellement sous forme épizootique dans les zones nouvellement infectées. *Mmc* est responsable des plus grandes pertes économiques chez les caprins des cinq continents et donne des formes sporadiques, enzootiques ou épizootiques. L'épidémiologie de *Mcc* et *Mp* est moins bien connue.

2.4.3- Evolution de la situation épidémiologique

2.4.3.1- Evolution dans le monde

L'épidémiologie de l'agalactie contagieuse a beaucoup évolué depuis les années 70 avec notamment une augmentation de la distribution géographique et de la fréquence des infections à *Mmc* et *Mcc*. L'extension de la maladie et l'apparition de nouveaux foyers peuvent s'expliquer de deux façons.

Premièrement l'augmentation des échanges d'animaux (importations et exportations) favorise l'extension géographique de la maladie et l'introduction des mycoplasmes dans des zones qui étaient indemnes. Il existe de nombreux exemples d'apparition de la maladie survenant tôt ou tard après l'introduction de nouveaux animaux. On observe par exemple l'apparition de cas sporadiques d'agalactie contagieuse dans des pays autrefois considérés indemnes : des infections à *Mmc* en Allemagne, en Suède et au Canada ou des infections à *Mcc* au Royaume Uni. Ce mode de contamination n'est bien sûr pas spécifique de cette maladie, mais prend une importance considérable compte tenu de la fréquence élevée des porteurs asymptomatiques.

Deuxièmement, l'intensification de l'élevage des ovins et surtout des caprins peut avoir favorisé des modifications dans l'expression clinique de la maladie. En effet, les chèvres laitières à haut potentiel de production, élevées intensivement en zéro pâturage et traitées mécaniquement semblent plus sujettes à développer des formes cliniques sévères que les chèvres élevées de façon traditionnelle avec une traite mixte (chevreau et machine à traire). Depuis l'intensification des systèmes d'élevage, l'émergence de *Mmc* et de *Mcc* a été clairement identifiée et a donné plus de formes aiguës et suraiguës que *Ma*. En France par exemple, les zones d'élevage traditionnel avec transhumance dans les Alpes et les Pyrénées-Atlantiques connaissent la forme enzootique « classique » à *Ma*, tandis que les départements où l'élevage est intensif subissent des cas, en général, sporadiques, à *Mmc* surtout [10].

2.4.3.2- Evolution dans les zones infectées

Dans les zones infectées traditionnellement par *Ma*, notamment dans le bassin méditerranéen, on observe une forte persistance de l'agalactie contagieuse sous forme enzootique entrecoupée par des flambées épizootiques. Dans certains pays, cette alternance de phases enzootiques et épizootique a été décrite comme récurrente ou cyclique [10].

En France, il existe un réseau d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses, VIGIMYC, de type « passif » : la décision initiale de rechercher des mycoplasmes est donc à l'entière initiative du vétérinaire praticien. Cette recherche est réalisée dans les laboratoires d'analyses vétérinaires à l'échelon des départements (40 agréés à ce jour). Si un mycoplasme est isolé, le laboratoire envoie l'isolat à l'Afssa-Lyon pour identification, accompagné des commémoratifs consignés sur des fiches normalisées [39]. Dans notre pays, il existait historiquement deux zones d'enzootie, la Savoie et les Pyrénées-Atlantiques, bassins d'élevage laitier à dominante caprine pour le premier, ovine pour le second. En Savoie, les mesures sanitaires, ont permis d'assainir la zone et sans doute d'éradiquer *Ma* (le dernier cheptel infecté remonte à 2002) [16]. Dans les Pyrénées-Atlantiques, la maladie est présente depuis au moins 1891 ; elle a toujours persisté malgré l'application de mesures semblables et même plus élaborées que celles appliquées en Savoie. On y observe semble-t-il des cycles d'approximativement 10 ans avec des phases de recrudescence de la maladie entre 1966 et 1967, entre 1976 et 1978 et entre 1985 et 1987 [10]. Entre ces pics, l'infection à *Ma* est présente de manière enzootique. Mis en place au début des années 1990, le programme de lutte sanitaire des Pyrénées-Atlantiques avait permis de circonscrire l'infection à quelques cantons de Basse-Navarre. Parmi les 3650 troupeaux professionnels ou « d'agrément » que compte le département, la prévalence de la maladie était ainsi passée de près de 3,5 % en 1992 à 0,54% en 2005. De 2003 à 2005, aucun nouvel élevage n'a déclaré la maladie, et au total, une vingtaine d'élevages infectés était dénombrée en 2005. La maladie s'est développée à nouveau à partir de 2006 avec 11 nouveaux cheptels infectés ; s'amorce alors une recrudescence. Au cours de l'année 2008, 135 foyers d'agalactie dont 95 nouveaux cas sont recensés. La prévalence de l'infection est ainsi de 3,7 %, proche de celle qui existait avant la mise en place des mesures prophylactiques. Fin 2010, approximativement 220 troupeaux sont infectés [16].

Dans les régions atteintes, la maladie évolue donc généralement de manière enzootique, avec la possibilité de flambées épizootiques. Elle semble difficile à enrayer.

L'évolution de la situation épidémiologique des infections à *Mmc* et à *Mcc* est moins bien connue [10].

2.4.3.3- Evolution dans les troupeaux infectés

2.4.4.3.1- Incidence

L'incidence est le nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période donnée et pour une population déterminée. Elle est un des critères les plus importants pour évaluer la fréquence et la vitesse d'apparition d'une pathologie [36].

Au sein d'un troupeau infecté, l'évolution de l'incidence est variable. La maladie peut apparaître très soudainement sous forme d'une « explosion » clinique ou affecter successivement un nombre limité d'animaux par « bouffées épidémiques ». Les « explosions cliniques » sont généralement précédées de quelques cas cliniques discrets lors de la lactation antérieure mais ces symptômes passent très souvent inaperçus.

Classiquement, des nouveaux cas échelonnés dans le temps apparaissent à intervalle régulier dans le troupeau en particulier dans les zones où la maladie est enzootique [10].

2.4.3.3.2- Prévalence

En épidémiologie, la prévalence est une mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné. Pour une affection donnée, elle est calculée en rapportant à la population totale, le nombre de cas de maladies présents à un moment donné dans une population (que le diagnostic ait été établi anciennement ou récemment). La prévalence est donc la proportion d'individus malades dans une population [37].

La prévalence au sein des cheptels est fortement influencée par deux facteurs non infectieux : le stade physiologique des animaux d'une part et les contacts et mouvements d'animaux liés à la transhumance d'autre part. De ce fait, la prévalence maximale est généralement observée à trois moments clefs : autour des mises bas, en début de période de traite et durant la transhumance estivale. Ceci est d'autant plus marqué dans les élevages ovins et caprins où la production est synchronisée.

Le premier pic, observé après les parturitions est typique de *Ma* mais peut aussi être observé lors d'infections à *Mmc* et à *Mcc*. Ce pic correspond souvent à l'expression d'une infection contractée pendant la transhumance ou suite à l'introduction d'un animal porteur asymptomatique lors de la lactation précédente.

Le démarrage de la traite peut donner lieu à un second pic surtout si celle-ci est mécanique.

Enfin, un troisième pic peut apparaître au cours de la transhumance du fait de l'augmentation inévitable des contacts entre les animaux et du stress lié aux changements de pâture [10].

2.4.3.3.3- Persistance

On distingue la persistance des signes cliniques, la persistance sérologique et la persistance microbiologiques qui ont des durées différentes.

Les quatre mycoplasmes impliqués dans l'agalactie contagieuse ont une persistance clinique relativement longue à l'échelon du troupeau. En l'absence d'intervention (abattage, antibiothérapie, vaccination), la persistance des signes cliniques est habituellement de l'ordre de plusieurs mois. Des récurrences sont possibles aux lactations suivantes sur le même animal ou sur d'autres animaux du troupeau. Par exemple, dans les Pyrénées-Atlantiques, entre 1984 et 1993, le taux de cheptels dans lesquels on a observé des récurrences a fluctué entre 10 et 30%. En zone d'enzootie, au fil des années consécutives à l'épisode initial de la maladie, l'atteinte clinique évolue dans un troupeau donné. Tout d'abord, les organes atteints préférentiellement varient d'une année sur l'autre chez les caprins : des transitions de formes mammaires à des formes oculaires ou respiratoires ou de formes pneumo-articulaires à des formes mammaires ont été décrites pour les infections à *Mmc* et à *Mcc*. Dans le cas de *Ma*, la maladie réapparaît parfois sur les primipares voire les jeunes à la mamelle au cours des années qui suivent l'épisode initial. Sur le long terme, la maladie évolue vers des formes sub-aiguës à chroniques qui restent souvent confinées à la mamelle.

La persistance sérologique est forte. Une estimation réalisée dans les Pyrénées-Atlantiques entre 1984 et 1992 montre une séro-négativation du troupeau par ELISA associée à la disparition des symptômes, en moyenne au bout de 5 ans après l'épisode clinique initial. Une enquête épidémiologique réalisée en Grèce a quant à elle montré que les anticorps contre *Ma* peuvent être détectés 3 ans après l'épisode initial pour les ovins et 8 ans après pour les caprins.

La persistance microbiologique peut également être longue avec des troupeaux devenus asymptomatiques mais toujours excréteurs 1 à 8 ans (et plus) après la déclaration de la maladie [10].

2.5- Epidémiologie analytique

2.5.1- Sources de mycoplasmes

Les animaux ont un rôle plus important que l'environnement en tant que sources de mycoplasmes.

2.5.1.1- Les animaux malades

L'excrétion maximale survient généralement pendant la phase clinique. Cependant, l'excrétion précède souvent l'apparition des premiers symptômes. La durée de l'excrétion préclinique varie de 1 à 10 jours suivant la dose, la voie d'inoculation et les espèces de

mycoplasmes. Les voies d'excrétion sont alors au minimum les suivantes : Le lait, les larmes, les sécrétions respiratoires, les fèces, les urines, et les sécrétions urogénitales [10].

2.5.1.2- Les animaux cliniquement guéris

Les mâles adultes, les femelles tarées ou non gravides et les agneaux peuvent constituer une source insidieuse de mycoplasmes. Ils peuvent en effet être porteurs de façon quasi asymptomatique et les excréter par voie rectale, nasale, oculaire ou génitale. Chez les femelles en particulier, une infection inapparente pourrait persister longtemps avant une explosion clinique à la faveur d'un stress tel que la mise-bas. Chez les agneaux, l'infection expérimentale avec *Ma* par différentes voies donne, selon la bibliographie, des infections souvent asymptomatiques mais surtout persistantes puisque *Ma* a pu être isolé à l'autopsie plus de 6 mois après l'inoculation. Chez les nouveau-nés, le portage, l'excrétion et l'expression de la maladie sont en plus influencés par l'immunité passive apportée par la prise colostrale. De ce fait, le moment de la gestation ou de la lactation au cours duquel les mères sont infectées est un élément déterminant dans le portage et l'excrétion ultérieure du jeune [10].

Les mâles et les jeunes étant des animaux susceptibles de subir beaucoup de mouvement entre les troupeaux (achats ou prêts), ils jouent surtout un rôle dans la diffusion des mycoplasmes à l'extérieur de leur cheptel d'origine.

De nombreuses études ont montré une excrétion permanente ou récurrente (après mise-bas) de certaines femelles laitières. Cette excrétion se fait surtout par le lait. A titre d'exemple, les durées d'excrétion déterminées par des expériences sont les suivantes : 3 semaines pour *Mp* sur des chèvres, 4 semaines pour *Mcc* chez des brebis, 5 mois pour *Ma* sur des chèvres et 10 mois pour *Ma* sur des brebis [10]. Un modèle expérimental d'infection chronique à *Ma* a été conduit pendant 5 ans sur des brebis. Dix brebis avaient subi une inoculation sous-cutanée et 20 brebis s'étaient contaminées naturellement par contact direct ou pendant la traite au cours de la première lactation. Dans cette expérience, les symptômes ont disparus à la deuxième lactation et l'excrétion à la troisième. D'après certaines expériences, chez des femelles adultes vaccinées avec des souches atténuées de *Ma*, le portage dans des nœuds lymphatiques ou les articulations dure 3 à 9 mois après inoculation [10, 11].

Les femelles en lactation, anciennement malades ou vaccinées jouent un rôle prépondérant dans le maintien et l'extension de l'infection au sein du troupeau car le lait est un vecteur important des mycoplasmes par la traite (aux autres femelles) ou par la tétée (aux nouveau-nés).

2.5.1.3- Les porteurs sains

Le portage asymptomatique dans l'oreille externe est le plus fréquent que ce soit sur des animaux provenant de troupeau contaminés ou au contraire sur des caprins issus de cheptels indemnes d'agalactie contagieuse clinique. De rares cas de portage vulvaire sur des femelles en bonne santé ont été rapportés, mais restent anecdotiques en comparaison du portage auriculaire [10].

2.5.1.3.1- Les caprins domestiques

Les quatre mycoplasmes impliqués dans l'agalactie contagieuse ont été retrouvés dans les conduits auditifs de chèvres. L'ordre de fréquence des isollements, réalisés principalement aux USA, en Australie et en France est le même que celui de la prévalence de ces mycoplasmes, avec du plus au moins fréquent : *Mmc*, *Mcc*, *Mp* et *Ma*. Des mycoplasmes ont également été retrouvés dans les tonsilles, la bouche, le nez et l'oreille moyenne de caprins. Plusieurs espèces différentes de mycoplasmes peuvent être présentes dans l'oreille d'un seul et même animal. L'explication de ce type de portage reste obscure et suggère l'intervention de vecteurs qui sucent le sang d'animaux en bactériémie comme des acariens (tiques) [10].

2.5.1.3.2- Les ovins domestiques

Le portage dans le canal externe de l'oreille est probablement moins fréquent que chez les caprins. Il n'a été rapporté que deux fois en Espagne, dont une seule fois pour des espèces impliquées dans l'agalactie contagieuse (*Mmc* et *Ma*). En France, le petit nombre d'études conduites pour trouver des porteurs sains ont donnés des résultats négatifs [10].

2.5.1.3.3- La faune sauvage

D'autres animaux tels que des bovins, des camélidés ou des petits ruminants sauvages (voire d'autres animaux) pourraient être des porteurs sains et constituer des réservoirs de la maladie. En effet, il existe un très grand nombre d'espèces de mycoplasmes ayant une spécificité d'hôte plus ou moins stricte. Les techniques d'isolement des mycoplasmes sont délicates et pas toujours maîtrisées. Par conséquent, les agents mycoplasmiens responsables de maladies de la faune sauvage et surtout d'infections silencieuses cliniquement sont mal connus. Cependant, les études menées par VIGIMYC ont permis de montrer que les souches domestiques étaient différentes de souches sauvages [13].

2.5.1.4- L'environnement

Du fait de leur absence de paroi, les mycoplasmes sont considérés comme fragiles. Ils sont sensibles à la chaleur, aux ultra-violets, à la putréfaction, aux antiseptiques et aux détergents classiques. Cependant, l'existence de biofilms pourrait permettre à certaines souches de résister plus longtemps dans le milieu extérieur.

Dans des conditions expérimentales, les mycoplasmes semblent pouvoir survivre au moins une à deux semaines à température ambiante, un à plusieurs mois entre 4°C et 8°C, et entre 6 mois et plusieurs années à -20°C. La survie diminue au dessus de 30°C. *Mmc* survit plus de 70 jours dans du lait de chèvre à 5°C.

Dans des conditions similaires à celles rencontrées sur le terrain, *M. bovis* survit plus longtemps à l'ombre qu'à la lumière et plus longtemps à 20°C qu'à de hautes températures. Des expériences ont montré que, placés sur divers substrats inorganiques (métal, verre, éponges synthétiques...), les mycoplasmes survivaient 1 à 18 jours. En France, des expériences réalisées en chambre de température ont permis de déterminer les durées de survie de *Ma* sur divers substrat organiques elle est de 7 jours sur du bois, dans de l'eau stérile ou non et dans du lait [10]. Les quelques estimations de survie disponibles montrent cependant une variabilité assez importante pour certains supports et/ou certains mycoplasmes, ce qui pourrait être mis en relation avec la découverte récente de leur capacité à former des biofilms, au moins sur des surfaces inertes (*M. agalactiae*, *M. bovis*) [7].

L'environnement peut donc servir de réservoir transitoire de mycoplasme.

2.5.2- Voies de pénétration

La voie mammaire peut être considérée comme la voie principale chez les femelles en lactation. Aux vue de l'intensité et de la durée de l'excrétion des mycoplasmes dans le lait, la pression microbienne subie par les trayons pendant la traite peut engendrer une contamination ascendante. La colonisation diathélique est favorisée par les défauts de technique (phénomène d'impact, ...) ou de matériel de traite et par l'absence générale d'antisepsie des trayons chez les petits ruminants. Expérimentalement, l'infection mammaire peut être facilement obtenue par inoculation dans diathélique responsables de l'agalactie contagieuse [10].

La voie orale est considérée comme une voie majeure pour les jeunes animaux, particulièrement pour les infections naturelles. Les infections sévères observées sur le terrain sur des jeunes non sevrés lors d'épisodes cliniques d'agalactie contagieuse résultent probablement de l'invasion de leur organisme par les mycoplasmes présents dans le lait ou le colostrum. L'adhésion et l'invasion auraient lieu au niveau de l'intestin grêle. L'infection et la

maladie peuvent être reproduites expérimentalement par voie orale chez des jeunes avec *Mmc* et *Mcc*. La possibilité d'une voie de pénétration orale est également étayée par l'isolement à l'autopsie de *Ma* dans l'intestin grêle et le rectum d'animaux atteints. L'administration expérimentale de *Ma* par voie orale à des chèvres adultes non gravides donne des infections asymptomatiques avec un portage intestinal important [10].

L'importance de la voie nasale ou respiratoire est difficile à estimer. Des différences significatives peuvent exister entre *Ma* et *Mp* d'un côté et le groupe « mycoïdes » de l'autre, dont les membres (*Mcc* et *Mmc*) ont un tropisme respiratoire majeur. Cette distinction est confirmée expérimentalement. L'infection des animaux par cette voie est favorisée par les contacts étroits, c'est-à-dire par la tétée chez les jeunes et par les fortes densités de population pour toutes les classes d'âge [10].

Dans les troupeaux infectés, une pénétration oculaire peut avoir lieu au cours de contacts étroits, par l'émission d'aérosols infectieux ou par l'instillation de particules contaminées. Quelques rares expériences d'inoculation de *Ma* ou de *Mmc* par voie conjonctivale ont donné des infections généralisées et fatales sur des agneaux. Des expériences menées en France avec inoculation par voie oculaire de *Ma* ont donné des affections asymptomatiques avec une colonisation des nœuds lymphatiques drainant le site d'inoculation au 7^{ème} ou au 14^{ème} jour suivant le titre de l'inoculum. L'extension à d'autres nœuds lymphatiques et à la rate révèle l'existence d'une bactériémie. Tous les nœuds lymphatiques céphaliques restent infectés au moins 60 jours post inoculation, suggérant une forte persistance ganglionnaire de *Ma* [38].

La voie génitale revêt une importance mal quantifiée en conditions naturelles, mais probablement limitée aux formes atypiques. Expérimentalement, la production de vulvo-vaginites granulaires avec *Ma* chez les chèvres donne une longue infection clinique contrairement à *Mcc* chez les brebis [10].

Dans les conditions naturelles, l'inoculation sous-cutanée ou intradermique (pendant la tonte ou à l'occasion de traitements réalisés avec la même aiguille sur plusieurs animaux) est possible, mais reste rare. Expérimentalement, la voie sous-cutanée est largement utilisée. Les voies intramusculaire, intraveineuse, intra-péritonéale et intracérébrale ont aussi été testées [10].

2.5.3- Modes de transmission

2.5.3.1- Transmission verticale

La transmission pendant la gestation de la mère au fœtus est fortement suspectée. *Ma*, *Mmc* et *Mcc* ont déjà été isolés à partir d'articulations de nouveau-nés à terme et *Mmc* a été retrouvé dans les organes internes d'avortons. De plus, les avortements observés au cours de certaines épizooties confirment que le placenta peut être affecté suite à une bactériémie. Cependant, les jeunes animaux séparés à la naissance de leur mère infectée ne développent pas toujours l'infection.

La transmission au cours de la mise bas, bien que non prouvée, ne peut être écartée.

La transmission au cours de la tétée reste le mode de transmission majeur, compte tenu de l'excrétion précoce, forte et persistante des mycoplasmes dans le lait.

2.5.3.2- Transmission horizontale

2.5.3.2.1- Transmission horizontale directe

La transmission horizontale directe d'animaux en phase clinique à des animaux sains existe. Ce mode de transmission varie en fonction de plusieurs facteurs. Il dépend premièrement de la voie principale d'excrétion. Ainsi, lors d'excrétion mammaire, la transmission directe entre adulte est limitée, ce qui n'est pas le cas lors d'excrétion respiratoire où les animaux malades émettent des aérosols infectieux contaminants. Le deuxième facteur déterminant dans ce mode de transmission est la densité de population puisque la promiscuité favorise la contagion par contact direct. Très peu de publications existent concernant la possibilité d'une transmission vénérienne ; celle-ci serait possible mais n'aurait que peu d'importance dans les conditions d'élevages que nous avons en France.

2.5.3.2.2- Transmission horizontale indirecte

L'intervention de vecteurs dans la transmission est suspectée, particulièrement chez les caprins, mais leur rôle exact reste à déterminer. Les parasites les plus fréquemment incriminés sont les acariens hématophages des oreilles qui sont porteurs de mycoplasmes et passent facilement d'un animal à l'autre. Les mouches et les tiques pourraient aussi être des vecteurs de *MmmLC*.

La transmission à partir de l'environnement existe mais son importance réelle demeure méconnue. Elle pourrait avoir une importance cruciale dans certaines régions (Pyrénées-Atlantiques par exemple) où différents cheptels partagent fréquemment des estives collectives ou des routes et des chemins dans les zones de forte population ovine. Les diverses

observations et les expériences menées sur ce sujet donnent des résultats contradictoires ; le risque paraît être dépendant du système d'élevage. De nombreux facteurs peuvent influencer sur ce mode de transmission : la résistance de la souche de mycoplasme et ses conditions de survie, la sensibilité des animaux, la durée et la fréquence d'exposition...

La transmission entre élevages par la tonte, les chaussures ou les véhicules a été mentionnée, mais doit rester anecdotique dans les zones où la présence de l'agalactie et ses risques sont connus.

La traite manuelle et surtout mécanique joue en revanche un rôle prépondérant dans la transmission du fait de la forte excrétion des mycoplasmes dans le lait et de leur fort tropisme mammaire. Les mauvaises pratiques de traite (défauts d'hygiène, absence de trempage des trayons, vide excessif de la machine, phénomène d'impact, ...) favorisent cette transmission en diminuant les défenses physiologiques de la mamelle et en favorisant le contact de mamelles saines avec du lait contaminé.

2.5.4- Facteurs de sensibilité

2.5.4.1- Facteurs animaux

2.5.4.1.1- L'espèce

La comparaison de sensibilité entre les ovins et les caprins est difficile du fait de la relative spécificité d'hôte des mycoplasmes et de l'existence de facteurs de confusion dans les expériences (sexe, âge, stade physiologique...). Néanmoins, il semble que, comme pour de nombreuses autres maladies, l'expression clinique soit plus importante chez les caprins que chez les ovins.

2.5.4.1.2- La race

Toutes les races de chèvres n'ont pas la même sensibilité à *M. capricolum capripneumoniae*, l'agent de la PPCC (Pleuropneumonie Contagieuse Caprine). Une variabilité similaire pourrait exister pour les agents de l'agalactie contagieuse. De plus, il existe une nette variation dans les symptômes exprimés par les différentes races à travers le monde en réponse à l'infection par un même mycoplasme. Par exemple, les races de caprins du Nigéria ne semblent pas développer de symptômes articulaires en réponse à l'infection par *Mmc*, alors que les caprins d'Amérique du Nord et d'Europe en présentent. De même, les races de Mongolie ne seraient pas très sensibles à *Ma*. Cependant ces observations sont à interpréter avec précaution car de nombreux autres facteurs de variation peuvent influencer ici, tels que les facteurs environnementaux, immunitaires et bactériens (variabilité de souche).

2.5.4.1.3- L'âge

Les jeunes animaux, particulièrement ceux qui ne sont pas sevrés, sont plus sensibles à *Mmc* et *Mcc*. Dans les épizooties naturelles, les jeunes présentent souvent des formes suraiguës mortelles. De même, l'inoculation expérimentale de jeunes animaux peut engendrer une bactériémie et des formes cliniques plus graves que celles des adultes. Dans le cas de *Ma*, l'effet de l'âge semble moins prononcé.

2.5.4.1.4- Le sexe et le statut physiologique

Les mâles adultes et les femelles non gravides ou tarées développent généralement des formes moins sévères que les femelles en lactation. La lactation pourrait favoriser la multiplication des mycoplasmes dans la mamelle qui est un organe cible majeur.

2.5.4.1.5- Le statut immunitaire

L'immunité qui se développe suite à une première infection ne semble pas empêcher les réinfections ultérieures, mais limite leur expression clinique. Dans les conditions naturelles, les récurrences cliniques de troupeaux intéressent, lorsqu'elles surviennent, les dernières classes d'âge (primipares surtout). Les mécanismes immunitaires et les effecteurs impliqués sont encore très largement inconnus. Comme pour beaucoup d'autres infections, la présence de maladies intercurrentes rend les petits ruminants plus sensibles à l'agalactie contagieuse.

2.5.4.2- Facteurs environnementaux

2.5.4.2.1- Le mode d'élevage

Il influe beaucoup sur la sensibilité des animaux. L'utilisation de machines à traire, dans de mauvaises conditions, les fortes densités de population et des logements inadaptés augmentent la sensibilité des animaux. Certains facteurs nutritionnels peuvent aussi avoir un rôle important. Les animaux élevés intensivement paraissent plus sensibles.

2.5.4.2.2- Les facteurs climatiques

Certains changements climatiques, sources de stress pour les animaux, semblent aggraver les manifestations cliniques. Les caprins semblent plus sensibles aux facteurs climatiques, particulièrement pour les infections à *Mp*.

2.6- Diagnostic

2.6.1- Diagnostic clinique et différentiel

La suspicion d'agalactie contagieuse est fondée à la fois sur des données épidémiologiques et sur les signes cliniques observés. Selon les troupeaux, l'espèce-hôte, l'espèce et la souche de mycoplasmes impliquée et l'ancienneté de l'infection, les symptômes observés peuvent être variables. A un extrême, le tableau clinique peut être complet et pathognomonique, avec une épizootie « explosive » survenant dans une zone où il n'y avait pas d'agalactie contagieuse auparavant (par exemple, dans un élevage intensif de chèvres laitières infectées par *Mmc* ou *Mcc*). A l'opposé, les symptômes peuvent être très discrets et de courte durée dans un élevage traditionnel d'ovins des Pyrénées-Atlantiques, zone d'enzootie. Les signes cliniques qui peuvent être observés ont été décrits précédemment et sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : fréquence des signes cliniques de l'agalactie contagieuse en fonction du mycoplasme causal

		<i>M. mycoides capri</i>	<i>M. capricolum capricolum</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. putrefaciens</i>
évolution		suraiguë à subaiguë	suraiguë à subaiguë	aiguë à chronique	subaiguë
symptômes	fièvre	++	+	+	-
	mammaires	+++	+++	++++	+++
	articulaires	++	++	++	+
	oculaires	+	+	++	-
	pulmonaires	++	++	+/-	-
	avortements	+/-	+/-	+/-	-
	septicémie foudroyante	++ (jeunes)	++ (jeunes)	+/- (jeunes)	-

Le diagnostic différentiel comprend des affections ovines ou caprines ciblant les mêmes organes :

- Diagnostic différentiel des mammites : mammites associées à une pneumonie et des arthrites dues à *Mannheimia haemolytica* ou à *Chlamydophila* spp., mammites à streptocoques, staphylocoques, mammites causées par d'autres mycoplasmes (extrêmement rares) ...
- Diagnostic différentiel des arthrites : CAEV, rouget (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)...

Dans tous les cas, les simples indices épidémiologiques et cliniques permettent de suspecter la présence d'agalactie contagieuse, mais ne permettent pas de conclure avec certitude sur l'implication de mycoplasmes, et encore moins sur l'espèce (ou la souche)

présente dans l'élevage. Le recours au laboratoire doit donc être systématique pour confirmer les suspicions.

2.6.2- Prélèvements [7, 10, 23]

2.6.2.1- Sur les animaux malades

Lors de suspicion clinique, les prélèvements doivent être faits sur des cas récents, non traités et représentatifs. Les organes à prélever en priorité sont ceux présentant les atteintes les plus nettes et ceux dont les prélèvements seront peu contaminés par des bactéries, des champignons et des mycoplasmes opportunistes : mamelle, articulation (sang sur syndrome anémique), plutôt que œil et appareil génital ; les prélèvements respiratoires sont souvent les plus contaminés. Il faut respecter de strictes précautions d'hygiène et si possible d'asepsie pour limiter ces contaminations et acheminer rapidement les prélèvements sous le couvert du froid positif (pas de congélation à -20°C).

Le lait est le prélèvement de choix, compte tenu du tropisme majeur pour la mamelle et de la facilité de prélèvement. Il doit être collecté aseptiquement (désinfection pour les trayons).

Le liquide synovial peut constituer un bon prélèvement, surtout après rinçage articulaire avec un bouillon de culture ou un sérum physiologique stérile pour en augmenter le rendement cultural. Ce prélèvement donne cependant des résultats inégaux, surtout lorsque l'arthrite est chronique. Il est principalement réalisé à l'autopsie compte tenu de sa difficulté (douleur, tonte et asepsie nécessaires). Le mieux est alors d'envoyer une articulation fermée au laboratoire.

L'écouvillonnage oculaire (culs-de-sacs conjonctivaux) et les prélèvements génitaux ou pulmonaires (autopsie) sont intéressants si ces organes sont atteints, mais pourront être contaminés par des micro-organismes ou des mycoplasmes saprophytes (*M. arginini*,...). La plus grande attention doit être portée au respect des conditions de propreté et d'asepsie (prélèvement large de poumon (10x10 cm) pour cautérisation). Les écouvillons doivent être placés très rapidement dans un milieu de transport ou de culture adéquat etensemencés sans délais. Dans certains cas, ils peuvent faire l'objet d'une PCR directe et donc être simplement réfrigérés ou congelés (*M. conjunctivae*).

2.6.2.2- Sur les animaux sans signes cliniques

Les motifs de prélèvements en l'absence d'expression clinique peuvent être variés : enquêtes épidémiologiques, gestion des introductions dans un troupeau, un département ou un pays indemne, prévention d'une traduction clinique avant un stress (tonte, transhumance,

vaccination, changement de machine à traire, allotement de jeunes de diverse provenance,...), troupeaux présentant une production laitière jugée insuffisante sans autre symptôme dans une zone d'enzootie...

A l'échelle du troupeau, il est recommandé de prélever du lait de tank. C'est ce qui est réalisé en France dans les départements mettant en œuvre un plan de lutte contre *M. agalactiae*. Ce prélèvement doit idéalement être réalisé à plusieurs reprises (en particulier en cas de négativité), plutôt en début de campagne (excrétion maximale) et d'emblée additionné d'antibiotique à large spectre (céphalosporine de dernière génération par exemple).

Les avantages du lait de tank sont nombreux. En premier lieu il est facile à prélever et très représentatif du cheptel puisque toutes les femelles en lactation contribuent à ce prélèvement. De ce fait, il a un coût modéré au total (même s'il faut répéter le prélèvement) comparé à une série de prélèvements individuels devant être représentative du troupeau. De plus, le lait est la voie d'excrétion principale des mycoplasmes et les seuils de détection paraissent bas, puisqu'il a été observé qu'une femelle excrétrice unique pouvait positiver un tank. Enfin, la spécificité est également bonne et les faux-positifs sont aujourd'hui considérés comme très rares : les contaminations environnementales ou à partir de la peau des trayons n'ont pas été évaluées chez les petits ruminants, mais semblent peu fréquentes, et l'isolement d'espèces opportunistes ou non pathogènes à partir du lait de tank est très rare.

Les inconvénients ou limites du lait de tank sont principalement les faux-négatifs qui peuvent être fréquents si l'on ne prélève qu'une fois les troupeaux (il est très probable que la valeur prédictive négative soit faible dans le cas d'un prélèvement unique). Ceci dépend cependant du stade de lactation des troupeaux prélevés et de l'étalement des mises bas (l'excrétion est maximale en début de lactation pour les troupeaux anciennement infectés). Enfin, le lait est une matrice biologique pouvant réduire la sensibilité analytique des techniques (inhibiteurs de croissance ou d'amplification par PCR).

Enfin, du sang peut être prélevé afin de réaliser des sérologies, mais il est conseillé d'éviter de prélever les brebis dans le dernier tiers de la gestation et dans le postpartum immédiat (« immunosuppression » postpartum). Il faut donc plutôt choisir des brebis en lactation depuis au moins 2 à 3 semaines ou des brebis tarées hors du dernier tiers de gestation [11, 27].

À l'échelon individuel, les prélèvements peuvent surtout intéresser le lait. En revanche, les écouvillonnages auriculaires présentent de nombreux inconvénients. Ils fournissent des informations peu interprétables du point de vue opérationnel. En effet, les

conduits auditifs externes représentent l'habitat le plus fréquent des mycoplasmes pathogènes ou non pathogènes chez la chèvre. Les 4 mycoplasmes de l'Agalactie contagieuse sont régulièrement identifiés, parmi d'autres, à partir d'écouvillonnages ou de lavages auriculaires. Une à six espèces différentes ont pu être différenciées à partir du même écouvillon. L'origine et la signification de ce type de portage ne sont pas bien définies. Les résultats positifs sont donc très difficilement interprétables.

2.6.3- Culture et isolement

Tous les laboratoires ne pratiquent pas l'isolement des mycoplasmes. En France, une trentaine de laboratoire seulement le font. Des études (conduites par VIGIMYC) ont prouvé que leurs résultats sont fiables pour la plupart ou que les erreurs minimales commises sont sans incidence sur la conduite ultérieure à tenir par le vétérinaire [26]. Les vétérinaires doivent donc prendre contact avec leur laboratoire d'analyses de proximité pour s'assurer de la possibilité de réalisation en routine de cultures mycoplasmiques. En deuxième intention, ces laboratoires peuvent adresser leurs cultures positives (en milieux liquide et solide si possible) à l'AFSSA Lyon pour une identification d'espèce réalisée gracieusement. Ce laboratoire anime le réseau français d'épidémiologie des mycoplasmoses des ruminants (VIGIMYC) [23].

Une culture initiale est nécessaire pour la majorité des mycoplasmes, à quelques exceptions près. Les laboratoires ensemencent les prélèvements précédents (sauf le lait de tank) à la fois sur milieu à large spectre (type gélose au sang) et sur milieux pour mycoplasmes. Les milieux de culture pour mycoplasmes doivent être spécifiques. Les espèces impliquées dans l'AC se cultivent toutefois sans difficulté sur ces milieux (un à deux jours pour *Mmc* ou *Mcc*, deux à cinq pour *Ma*). La meilleure solution est de commencer par ensemencer en bouillons mycoplasmes, permettant un repiquage aisé, un étalement éventuel sur gélose, puis une congélation éventuelle et un envoi postal facile [7, 10, 12]. De nombreux milieux ont été décrits pour l'isolement des mycoplasmes ; la formule du milieu d'Eaton applicable dans la plupart des cas est recommandée par l'OIE et décrite dans le manuel de l'OIE 2005 (Annexe 1)

L'acétate de thallium (250 mg/litre), qui est inhibiteur pour divers microorganismes autres que ceux impliqués dans le syndrome agalactie contagieuse, et l'ampicilline (ou une autre β lactamine) qui détruit d'autres bactéries possédant une paroi permettent de contenir la contamination bactérienne des prélèvements issus du terrain [10, 12].

Le protocole pour l'ensemencement est décrit dans le manuel de l'OIE 2005 est présenté dans l'annexe 2.

Les prélèvements à analyser peuvent contenir plusieurs espèces de mycoplasme, ce qui nécessitait autrefois un isolement des colonies par clonage avant de réaliser les épreuves biochimiques et sérologiques, en particulier les tests d'inhibition de croissance ou de film (GIT et FIT respectivement pour *Growth and Film Inhibition Tests*). Le clonage est une opération longue à réaliser demandant au minimum 2 semaines, ce qui conduit à préférer d'autres épreuves d'identification ne nécessitant pas cette étape : l'épreuve d'immunofluorescence, l'épreuve dite de « dot immunobinding » (immuno-empreinte) et, plus récemment la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

2.6.4- Identification

2.6.4.1- Épreuves biochimiques

La première épreuve qui était à réaliser sur les cultures clonées de mycoplasmes à identifier était l'épreuve à la digitonine, qui permettait la séparation des mycoplasmes et des acholéplasmes (contaminants usuels capables de croître et de masquer des mycoplasmes d'intérêt).

La croissance en milieu liquide contenant du glucose (1 %), de l'arginine (0,2 %), et du phénol-phthaléine diphosphate (0,01 %) pour la recherche d'un film de croissance et, sur milieu gélosé contenant du sérum de cheval ou du jaune d'œuf, pour rechercher la protéolyse de la caséine ou du sérum coagulé, figuraient parmi les épreuves qui étaient les plus utiles pour différencier les 4 mycoplasmes responsables de l'agalactie contagieuse. La caractéristique biochimique caractérisant *M. putrefaciens* par rapport aux autres mycoplasmes était l'odeur de putréfaction typique de cette espèce. D'autres propriétés pouvaient être utiles comme par exemple la formation d'un « film » (cristallisation en surface) ou de « spots » (cristallisation sous forme de précipités) à la surface des cultures âgées avec *Ma*, et dans une moindre mesure avec *Mp*, ou encore l'activité protéolytique de *Mcc* et *Mmc* sur la caséine et le sérum coagulé.

Récemment, une épreuve biochimique rapide et facile à mettre en œuvre et exploitant l'activité C8-estérase de *M. agalactiae* a été décrite [12].

Cependant, les tests biochimiques sont coûteux, fastidieux et difficilement interprétables. En routine, on leur préfère à l'heure actuelle les épreuves sérologiques ou la détection génomique.

2.6.4.2- Identification sérologique

Historiquement, les méthodes sérologiques ont fait appel à l'inhibition de croissance, l'inhibition du métabolisme, l'immunodétection sur colonies révélée par fluorescence ou par la peroxydase [16]. Pour *M. agalactiae*, l'inhibition de « film » était souvent plus fiable que l'inhibition de croissance utilisée pour les autres mycoplasmes. Après avoirensemencé des boîtes de pétri avec une culture clonée, des disques de papier imbibés d'antisérum spécifique étaient placés sur les boîtes de pétri. Les boîtes étaient incubées dans les mêmes conditions que pour les cultures de mycoplasmes et examinées chaque jour pour la recherche d'une inhibition. Une zone d'inhibition de plus de 2 mm, mesurée depuis le disque de papier jusqu'à la limite de croissance du mycoplasme était considérée comme significative. Une inhibition partielle pouvait être observée avec un antisérum faible, ou lorsqu'il y avait mélange de mycoplasmes dans la culture.

Dans l'épreuve d'immunofluorescence indirecte, les antisérums spécifiques sont appliqués sur les colonies isolées sur gélose. L'antisérum homologue reste attaché à la colonie après lavage, et l'ensemble est visualisé grâce un conjugué marqué par la fluorescéine sous un microscope à épifluorescence [12].

Aujourd'hui, un test d'immunoempreinte après filtration sur membrane (*dot blot immunobinding*) est utilisé en France : les mycoplasmes sont retenus sur une membrane par filtration des cultures, et identifiés au moyen d'antisérums hyperimmuns polyclonaux [16]. La spécificité obtenue est au moins équivalente aux tests précédents et la sensibilité meilleure. Grâce à l'utilisation de cupules en plaques de 96 puits, cette méthode offre un bon rendement avec une bonne faisabilité et une standardisation aisée ; elle peut donc être utilisée par des laboratoires non spécialisés comme procédure standard [10, 16]. Le test peut être directement appliqué à des cultures fraîches ou stockées, et ne prend que 2 à 3 heures. Il peut en plus détecter des mélanges de mycoplasmes.

Les antisérums utilisés au cours de ces réactions sont préparés à partir de souches de référence des espèces de mycoplasmes ciblées, et la plupart des isolats de terrain peuvent être reconnus par ces antisérums. Cependant, l'interprétation n'est pas toujours aisée car des réactions croisées existent. Elles sont possibles entre *M. agalactiae* et *M. bovis*, phylogénétiquement proches. De même, il peut être difficile d'identifier *Mmc* et *Mcc* qui appartiennent tous deux au groupe « mycoïdes ». Ce groupe est composé de nombreuses espèces de mycoplasmes des ruminants qui partagent de nombreuses propriétés antigéniques et génétiques, mais causent des maladies différentes. Il est donc parfois difficile de différencier les différentes espèces de ce groupe. De plus, une grande variabilité antigénique intra-spécifique a été décrite pour *M.*

agalactiae, *Mmc* et *Mcc*, alors que *Mp* semble moins variable. Cette variabilité impose aux laboratoires de diagnostic de disposer de plusieurs antisérums susceptibles de reconnaître toutes les souches de l'espèce de mycoplasme à identifier [10, 12]. Ces difficultés seront peut être surmontées dans le futur grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour certains mycoplasmes. A l'heure actuelle, quand un doute subsiste, on peut faire appel à la détection de séquences spécifiques d'espèces par PCR et au séquençage partiel de gènes comme l'ARNr 16S [16].

2.6.4.3- Détection génomique

La réaction d'amplification par polymérase ou PCR (pour *polymerase chain reaction*) représente une technique intéressante pour les mycoplasmes, microorganismes à culture plus ou moins lente. Elle est désormais utilisée en routine dans de nombreux laboratoires de diagnostic et se révèle très sensible. Sa spécificité, bien qu'imparfaite et dépendante de l'espèce et des amorces, est acceptable pour un test de dépistage [28]. Plusieurs techniques de PCR, spécifiques pour *M. agalactiae* ont été décrites et ont montré une sensibilité quasi identique, bien que basées sur la détection de séquences géniques différentes. Les cibles choisies doivent être à la fois spécifiques inter-espèces et conservées de manière intra-spécifique. De nombreuses cibles peuvent être utilisées comme l'ARN 16S, le gène *uvrC*, le gène *polC*, le gène de la protéine P80... Des techniques d'identification par PCR ont également été décrites pour *Mmc* et *Mcc*, et une PCR est en cours de développement et d'évaluation pour *Mp* au Royaume-Uni.

Ces techniques peuvent être appliquées directement pour les prélèvements obtenus par écouvillonnage (yeux, oreilles) ou pour les liquides articulaires. Elles peuvent aussi être mises en œuvre sur du lait, mais avec une sensibilité généralement inférieure à celle obtenue après culture (présence d'inhibiteurs de la PCR dans le lait). Cette technique sans culture permettrait pourtant un gain de temps (de plusieurs jours à seulement quelques heures sans culture) [29]. La PCR peut être aussi utilisée directement sur les colonies de mycoplasmes à identifier.

Un risque de faux positifs dus à des contaminants existe. Ainsi, un résultat positif, particulièrement à partir d'une zone ou région reconnue jusqu'alors indemne d'agalactie contagieuse, doit toujours être confirmé par l'isolement et l'identification du mycoplasme en cause avec les méthodes standard [10, 12].

2.6.5- Diagnostique sérologique

2.6.5.1- Fixation du complément

Les recherches sur les tests de fixation du complément ont commencé dans les années 70 pour *Ma* et dans les années 80 pour *Mmc* et *Mcc* [10].

Le test de fixation du complément est généralement considéré comme difficile à réaliser et le sérum utilisé doit être de bonne qualité. L'antigène est préparé à partir de bactéries lavées, standardisées par turbidimétrie et lysées soit par traitement aux ultra-sons soit par action du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) suivie d'une dialyse. Les sérums sont inactivés à 60°C pendant 1 heure, et la réaction est réalisée dans des microplaques avec une fixation du complément à froid durant une nuit ou à chaud à 37°C pendant 3 h. Le système hémolytique est ensuite ajouté et la réaction est lue après la lyse complète de la cupule témoin antigène. Un résultat est positif lorsqu'il y a lyse complète à partir de la dilution du 1/40e ou supérieure pour les mycoplasmes suivants : *M. agalactiae*, *Mcc*, et *Mmc* [12].

Le test de fixation du complément a une spécificité relativement faible. En effet, beaucoup de faux positifs pour *Ma* et beaucoup de réactions croisées pour *Mmc* et *Mcc* ont été observés. D'autres essais ont donné lieu à des faux négatifs et à la non détection de porteurs sains.

Avec ce test, les anticorps sériques sont détectables dès l'apparition des premiers symptômes, 3 à 15 jours après l'inoculation d'un adulte avec *Ma* et 4 semaines après pour un agneau. Les anticorps persistent plusieurs mois, voire plus d'un an. Des résultats similaires ont été rapportés pour des infections naturelles à *Ma* et *Mcc*.

Le test de FC est plutôt considéré comme une épreuve de troupeau et 10 sérums au minimum doivent être testés pour chaque troupeau en incluant si possible des cas d'agalactie récents et anciens. Ce test a été progressivement abandonné au profit des techniques ELISA.

2.6.5.2- Épreuves immuno-enzymatiques

Les techniques immuno-enzymatiques ont été introduites en 1982 pour l'agalactie contagieuse et ont principalement été développées pour *Ma* (et *Mmc*). Un test trivalent a été proposé pour *Ma*, *Mmc* et *Mcc*. Aujourd'hui, le diagnostic sérologique repose essentiellement sur des tests ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) basés sur des antigènes totaux ou quelques antigènes recombinants [10].

Les tests ELISA avec un antigène traité aux ultrasons ou avec le Tween 20 se sont révélés plus sensibles que le test de FC pour la détection des anticorps contre *M. agalactiae*. Cependant, ces techniques présentaient des problèmes de spécificité. Les nombreux résultats faux-positifs obtenus pouvaient être partiellement dus à des infections mixtes par plusieurs

mycoplasmes en particulier dans les cas de *Ma* et *Mmc* (chèvres), mais il s'agissait pour la plupart de réactions croisées. Certains sera ovins réagissent ainsi avec des antigènes bactériens ou parasitaires, indépendamment de l'agalactie contagieuse [10]. L'utilisation de conjugués avec un anticorps monoclonal anti-immunoglobulines d'espèce ou avec la protéine G a permis d'améliorer significativement les problèmes de spécificité sans affecter la sensibilité. L'utilisation de ce dernier conjugué a permis d'éprouver des sérums de nombreuses espèces susceptibles d'être infectées par les mycoplasmes, y compris les camélidés [12]. Une autre étude a montré que l'utilisation de peptides recombinants au lieu d'antigènes inactivés améliore notablement la discrimination entre les animaux sains et ceux contaminés par *Ma* [30].

Les études des cinétiques d'anticorps sériques détectables par ELISA ont montré que, chez des brebis inoculées par voie sous-cutanée avec *Ma*, les immunoglobulines G (Ig G) peuvent être détectées pendant au moins 13 mois après inoculation, alors que les immunoglobulines M (Ig M) apparaissent plus vite mais disparaissent plus tôt. Dans une autre expérience, l'inoculation sous-cutanée de dix brebis avec *Ma* a donné une séroconversion, concomitante avec l'apparition des symptômes, 6 à 9 jours après l'injection. Elle dure environ 9 jours. Des cinétiques similaires ont été obtenues sur des brebis naturellement infectées. En suivant des infections chroniques, certains chercheurs ont montré que les anticorps peuvent persister plus de 3 ans. Les cinétiques d'anticorps dépendent du titre de l'inoculum et de la voie d'inoculation. Le cycle physiologique des femelles influe sur les titres d'anticorps (gestation).

En France, historiquement deux kits commerciaux ont été utilisés. Le premier, basé sur l'antigène total de la souche de référence PG2, n'est plus commercialisé depuis 2007. Le second, basé sur un antigène recombinant, évalue la réponse sérologique vis-à-vis de l'antigène P48, qui est une protéine de surface majeure. C'était le seul test commercialisé dans notre pays jusqu'en 2009 (coffret fabriqué par IDEXX/POURQUIER) [11, 16, 26, 21]. Selon une étude de Pépin *et al.*, ce kit présente à l'échelon individuel une bonne spécificité (99%), mais une sensibilité plus faible (82%). A l'échelon du troupeau, la spécificité décroît, mais reste acceptable (92%) et la sensibilité devient maximale (100%). A l'échelon individuel, la sérologie ne constitue donc qu'un outil de dépistage et non de diagnostic [16]. Un coffret proposé par LSI est en cours d'évaluation. C'est un test ELISA indirect utilisant un antigène mycoplasmaïque total, qui présenterait, d'après les premières études, une meilleure sensibilité que le test actuel, mais une spécificité inférieure [21].

L'utilité de ce diagnostic sérologique réside principalement dans le dépistage au niveau collectif. En région infectée, un indice sérologique de troupeau, calculé sur la base des

résultats d'un échantillon de sérums individuels, était depuis 1990 un des outils fondamentaux de la qualification des cheptels en vue de l'organisation des programmes de contrôle. Le nombre d'animaux à prélever par cheptel était alors calculé en fonction de la taille moyenne des troupeaux et de la prévalence supposée [10, 16].

2.6.5.3- Epreuve d'immuno-empreinte sur membrane (immunoblot)

Les épreuves d'immunoblot ont été décrites comme étant les plus sensibles et les plus spécifiques pour *M. mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony, l'agent causal de la péripneumonie bovine. De telles épreuves ont aussi été décrites pour *M. agalactiae*. La présence de bandes intenses aux tailles approximatives de 80 et 55 kDa démontrerait la présence d'anticorps anti-*M. agalactiae* dans les sérums testés, alors que des sérums en provenance d'animaux de troupeaux indemnes ne donnent aucune bande ou de faibles bandes à différentes tailles. La dilution des sérums au 1/50e accroît la différence entre les sérums positifs et négatifs [12].

2.7- Traitement

2.7.1- Choix du schéma thérapeutique

Le premier traitement historique de l'agalactie contagieuse était basé sur l'emploi de dérivés d'arsenic, des sels de sodium et de zinc et d'acetarsol. [10]

L'emploi d'antibiotiques est désormais largement répandu, mais peu d'informations sont disponibles sur leurs modalités d'utilisation et sur leur efficacité réelle. L'objectif principal d'un traitement antibiotique est symptomatique. Il vise une amélioration de l'état clinique des animaux malades et cherche à empêcher une éventuelle mortalité, surtout chez les caprins. Tout au plus, favorise-t-il une guérison clinique et une reprise de la lactation, mais l'obtention d'une guérison bactériologique est illusoire. Un autre objectif de l'antibiothérapie peut être de limiter l'excrétion par les animaux malades et, ainsi, de limiter la propagation de l'épidémie au sein ou à l'extérieur du cheptel atteint [21, 22]

Pour être efficaces, les antibiotiques utilisés doivent présenter les caractéristiques suivantes : activité sur les bactéries dépourvues de paroi, bonne diffusion tissulaire, grande capacité à passer du compartiment sanguin vers la mamelle, voire de s'y concentrer, et concentrations minimales inhibitrices faibles [10, 16, 22].

Les principales molécules utilisées sont les tétracyclines, les phénicolés (florfénicol, chloramfénicol interdit sur les animaux de rente), les fluoroquinolones (marbofloxacin,

enrofloxacin, danofloxacin...) et les macrolides au début (tiamuline, tylosine, erythromycine, spiramycine...). La danofloxacin a une excellente activité *in vitro* contre *M. hypopneumoniae*, *M. dispar*, *M. bovis genitalium* et une activité similaire à celle de la tylosine sur *M. bovis*. En général, la sensibilité des mycoplasmes aux antibiotiques est la suivante (antibiotiques classés du plus au moins actif) : tiamuline, tylosine, oxytétracycline. Une étude conduite en 2007 sur 28 souches de *Ma* a montré que, parmi les 16 antibactériens utilisés, les plus efficaces contre toutes les souches (sur la base des CMI c'est-à-dire des Concentrations minimales inhibitrices) sont les fluoroquinolones, les tétracyclines et les macrolides [25]. Il y a cependant de grandes variations de sensibilité entre les différentes espèces et entre les différentes souches.

Pour *M. agalactiae*, plusieurs études ont été publiées entre 1972 et 2008 sur les CMI de divers antibiotiques sur des souches italiennes, espagnoles et turques. Les CMI les plus basses en moyenne seraient obtenues pour la tiamuline, la tylosine, la spiramycine, la lincomycine, la danofloxacin, la norfloxacin, la ciprofloxacine et l'oxytétracycline, avec une variabilité importante d'une étude à l'autre.

Les CMI des souches françaises n'ont pas été publiées [10, 25]. Une étude conduite sur 28 souches espagnoles de *Ma* a montré une résistance de toutes les souches à la streptomycine, à l'erythromycine et à l'acide nalidixique et de 2 des souches à la tétracycline [25].

La synthèse des informations disponibles sur les CMI des antibiotiques sur *Mmc*, *Mcc* et *Mp* est difficile puisque les méthodes utilisées varient d'une publication à l'autre. D'une manière générale, ce sont certains macrolides qui présentent les CMI les plus basses dans ces pays du pourtour méditerranéen (tylosine, spiramycine,...). Des résistances à la lincomycine, spectinomycine, gentamycine, streptomycine,... sont observées. Une hétérogénéité des valeurs de CMI apparaît dans plusieurs études pour une espèce mycoplasémique, une molécule et un pays (ou une région) donné : oxytétracycline et *Mp* ou *Mcc*, tylosine et *Mmc* (Jordanie, Maroc,...).

De même en France, des souches de *Mp* du Centre-ouest montrent de fortes valeurs de CMI vis-à-vis de la gentamycine, de la streptomycine, de la spectinomycine et, pour certaines, de la lincomycine, de la chlortétracycline et de l'oxytétracycline. Macrolides et fluoroquinolones présentent dans cette étude des CMI basses [23].

Des essais ont été menés à l'ENVIT avec des molécules n'ayant pas d'autorisation de mise sur le marché pour l'espèce ovine. Les animaux (hors lots témoins) ont été traités au tarissement avec le florfenicol (Nuflor®) ou de la gamithromycine (Zactran®). La recherche de *M. agalactiae* est réalisée dans le lait et dans les sécrétions oculaires et nasales avant tarissement et après mise-bas. Si ce traitement antibiotique s'avère efficace et s'il est utilisé sur le terrain,

un suivi de l'antibiorésistance devra impérativement être mis en place. S'agissant d'antibiotiques à large spectre, il ne faudra pas négliger le risque de développement de résistances chez d'autres espèces bactériennes que les mycoplasmes [21].

Les études en faible nombre qui ont porté sur l'efficacité des antibiotiques sur le terrain donnent des résultats très variables et le plus souvent décevants, sauf dans le cas de traitements prolongés difficilement acceptables financièrement et donc peu conciliables avec les contraintes du terrain. De plus, compte tenu de l'importance de la localisation mammaire des mycoplasmes, particulièrement dans les formes chroniques, certains auteurs recommandent l'utilisation de traitements intra-mammaires au tarissement (en association avec l'utilisation d'antibiotiques par voie générale) [10].

La fréquence du portage subclinique, la contagiosité et la forte chronicité des infections imposent idéalement de traiter tous les animaux du troupeau. Compte tenu de l'effectif important des cheptels, les molécules "longue action" ou formes galéniques dite "retard" sont souvent privilégiées par les praticiens.

2.7.2- Limites du traitement

En premier lieu, il est important de rappeler que le traitement de l'AC est déconseillé dans les départements français (Pyrénées Atlantiques, de la Savoie et de la Haute Savoie) appliquant une réglementation locale (Arrêtés préfectoraux) fixant les règles d'une prophylaxie à caractère purement sanitaire, dans un but d'éradication. En effet, l'antibiothérapie peut favoriser l'émergence de porteurs chroniques asymptomatiques sans diminuer significativement la fréquence du portage [7, 21].

Dans les zones où le traitement de l'agalactie contagieuse est autorisé et même recommandé, ce traitement reste souvent peu efficace. Ce défaut d'efficacité des différents traitements envisagés peut avoir plusieurs explications.

Tout d'abord, les échecs de traitement peuvent être dus à des sous-dosages du fait du grand nombre d'animaux à traiter et de la méconnaissance des CMI précises sur les souches françaises de mycoplasmes [10].

De plus, les sites infectieux ou de portage peuvent correspondre à des tissus dans lesquels la diffusion de certains antibiotiques par voie générale n'est pas bonne (culs-de-sacs conjonctivaux, portage buccal ou auriculaire (cérumen), cellules sanguines...). La diffusion est encore plus mauvaise en phase chronique à cause des modifications histologiques

provoquées par l'infection ou par l'inflammation : nécrose voire séquestres pulmonaires, foyers de sclérose parenchymateuse, ankylose articulaire, abcès cornéens... [23, 10].

En outre, comme nous l'avons évoqué précédemment, des interrogations persistent sur l'implication des biofilms et la localisation intracellulaire possible des mycoplasmes dans les échecs thérapeutiques observés.

Ensuite, se pose la question de la faisabilité du traitement et donc de son observance. Des injections répétées sur une grande quantité d'animaux d'antibiotiques par voie générale ou de spécialités intra-mammaires représentent une énorme quantité de travail, beaucoup de temps, mais aussi beaucoup d'argent. De plus, les injections intra-mammaires peuvent occasionner des complications à cause des mauvaises conditions d'hygiène. Les injections systémiques amènent le risque de réactions locales au site d'injection (œdème...) et peut-être de sélection de sous-populations bactériennes résistantes.

Enfin, le coût moyen par animal est élevé par rapport à la valeur de réforme (en particulier chez la chèvre), sans que l'on puisse garantir la récupération fonctionnelle. Le traitement des animaux en lactation se heurte au problème des pertes économiques engendrées par les temps d'attente. Cependant, le traitement de tous les animaux du cheptel (et non uniquement de ceux cliniquement atteints) est fortement recommandé. Globalement, le rapport coût/bénéfice d'une antibiothérapie est discutable, surtout si une durée de traitement au dessus des CMI suffisamment longue est visée (généralement au minimum une semaine de traitement).

En conclusion, le traitement demeure aujourd'hui incontournable dans notre pays en filières caprine et ovin viande. Il est recommandé d'instituer des traitements longs (au moins une semaine) par voie générale intéressant si possible tout le troupeau. Après la phase aiguë, un traitement injectable longue action au tarissement, éventuellement associé à un intra-mammaire contenant un macrolide, peut être proposé (le nombre optimal d'injections successives serait à valider). Il n'est pas possible aujourd'hui de recommander, sur la base d'essais contrôlés publiés, telle ou telle molécule au sein des principales familles indiquées (macrolides et apparentés, tétracyclines, fluoroquinolones). Rappelons que ces dernières ne doivent pas être utilisées en première intention.

2.8- Prophylaxie

2.8.1- Prophylaxie médicale

2.8.1.1- Chimio-prévention

La mise en place d'une antibioprofylaxie est difficilement envisageable, compte tenu de l'insidiosité de la transmission et du portage, et du caractère chronique et persistant des infections. Certains auteurs étudient cependant la possibilité de mettre en œuvre un traitement antibiotique au tarissement, principalement dans les troupeaux infectés [16].

2.8.1.2- Immunoprévention

Aucun vaccin n'est autorisé sur le marché français depuis 1988. Dans le monde, plusieurs vaccins inactivés et atténués ont été développés et sont utilisés. Ils sont principalement dirigés contre *Ma* (et *Mmc* ou *Mcc*). Bien que les infections à *Mcc* et *Mp* soient sévères, leur faible prévalence n'a pas encouragé le développement de vaccins contre ces 2 mycoplasmoses animales.

2.8.1.2.1- Vaccins inactivés

De nombreux vaccins inactivés contre *Ma* ont été développés et utilisés depuis le milieu du XX^{ème} siècle dans le bassin méditerranéen et dans l'est de l'Europe. Ils sont aujourd'hui utilisés dans des régions enzootiques, en particulier dans les troupeaux atteints de manière chronique.

Les mycoplasmes sont inactivés par la chaleur, le formol ou d'autres substances et accompagnés ou non d'adjuvants immunogènes (hydroxyde d'aluminium par exemple). Une étude montre que la méthode d'inactivation peut influencer sur l'efficacité du vaccin obtenu : les vaccins inactivés avec du phénol ou de la saponine conduisent à de plus hauts titres en anticorps protecteurs que ceux inactivés avec de l'hypochlorite de sodium, du formol ou avec un traitement thermique, et offrent donc une meilleure protection contre le développement de la maladie [24]. Les titres des cultures initiales sont élevés (10^6 à 10^{10} UFC/ml). Les cultures utilisées proviennent soit de souches entretenues en laboratoire, soit d'isolats originaires du foyer d'infection à vacciner dans le cas des auto-vaccins (lait mammiteux, tissus d'animaux infectés...). On utilise en général les souches locales pour préparer les vaccins, mais il est possible de combiner plusieurs souches de *Ma* de différentes origines.

L'immunité conférée est partielle et de courte durée, obligeant à des injections de rappel très rapprochées (jusqu'à un rappel tous les 3 mois). La plupart des protocoles vaccinaux comprennent une primo-vaccination suivie de multiples rappels plus ou moins rapprochés. Par

exemple, une source recommande d'injecter à chaque chèvre 3 doses avant la mise-bas et une après. L'innocuité de ces vaccins est bonne et seules de rares réactions d'hypersensibilité sont observées quand les vaccins sont administrés à de très courts intervalles.

Globalement, les résultats obtenus sont décevants, quelle que soit la souche ou l'adjuvant retenus. Ces vaccins ne protègent pas contre l'infection, au mieux permettent-ils une atténuation des signes cliniques. Leur utilisation risque ainsi de favoriser l'apparition d'excréteurs asymptomatiques et fait courir le risque de masquer certaines infections naturelles.

Enfin, l'utilisation de ces vaccins peut fausser les résultats des tests ELISA et faire augmenter les indices sérologiques des troupeaux vaccinés.

Concernant *Mmc* et *Mcc*, très peu de vaccins ont été développés et très peu d'informations sont disponibles sur leur efficacité. Brièvement, ces vaccins sont produits de la même manière que ceux contre *Ma*, les protocoles vaccinaux sont semblables et leur efficacité demeure limitée et mal évaluée.

2.8.1.2.2- Vaccins vivants atténués

Des essais sur ces vaccins ont été menés en Mongolie, en Roumanie et en Turquie. Des vaccins vivants atténués contre *M. agalactiae* ont été largement utilisés en Europe de l'Est, dans les Balkans et dans le bassin méditerranéen, mais sont désormais interdits dans de nombreux pays. Ils offrent apparemment une meilleure protection que les vaccins inactivés contre l'expression clinique. En revanche, ils produisent, sur les animaux vaccinés, une infection souvent asymptomatique avec excrétion transitoire de mycoplasmes. Les manifestations cliniques de sévérité variable qui peuvent apparaître impliquent un strict respect des conditions d'utilisation : respect des doses maximales et des contre-indications liées à l'âge et au stade physiologique (lactation). Enfin, l'incompatibilité avec le diagnostic sérologique et le traitement est inhérent à ce type de vaccination.

En conclusion, l'utilité des différents types de vaccins est très discutable même si leur utilisation ne diminue pas. Idéalement, ils devraient diminuer les signes cliniques et l'excrétion par les animaux infectés, protéger les animaux indemnes, tout en autorisant la différenciation entre cheptels infectés et vaccinés. Aux vues des modestes performances de ces vaccins, leur seul intérêt est de limiter les pertes économiques dues aux manifestations cliniques dans les régions enzootiques. Les vaccins inactivés, combinés à une antibiothérapie adaptée peuvent aider au contrôle des infections chroniques mais ils interfèrent avec les

programmes prophylactiques locaux. Les vaccins peuvent cependant représenter une solution alternative et provisoire dans les parties du monde où les conditions techniques, psychologiques et financières nécessaires à un programme de prophylaxie ne peuvent pas être rassemblées [10, 12]

2.8.2- Prophylaxie sanitaire

Dans cette partie, nous traiterons exclusivement du cas de la France.

2.8.2.1- Contrôle de la maladie dans un troupeau infecté

2.8.2.1.1- Réduction des sources de mycoplasmes

Lors de l'apparition d'un foyer confirmé, il est théoriquement conseillé de procéder à l'abattage total du cheptel, compte tenu de la forte contagiosité des mycoplasmes, du caractère insidieux, durable et fréquent du portage, de la faible efficacité des mesures de lutte et de la difficulté d'assurer un repeuplement à la fois à partir d'animaux sûrement indemnes et de même race. Le recours à l'abattage total des cheptels infectés est en effet une option prévue dans les arrêtés préfectoraux, mais cela reste une démarche volontaire assez diversement mise en œuvre selon les secteurs géographiques. Si cet abattage total est généralement accepté dans les zones indemnes, il est (très) difficile à faire accepter dans les régions enzootiques [7, 10]. Par exemple, lors de l'épisode de la vallée d'Ossau en 1993, tous les troupeaux infectés ont été abattus (4 500 brebis). En revanche, le nombre d'abattages totaux réalisés depuis 2006 apparaît faible et un pourcentage important de ces abattages n'a pas été suivi de renouvellement, probablement en raison d'une cessation d'activité (de 20% à plus de 50% selon les années) : en 2006 sur 33 troupeaux infectés, seuls 7 ont subi un abattage total ; de même en 2009 sur 59 troupeaux infectés, 5 ont subi un abattage total [21].

Les freins à la mise en œuvre de cette mesure sont multiples. Sur le plan zootechnique, l'abattage total pose un problème majeur pour des races dont les effectifs sont limités. Le renouvellement en races locales avec des animaux ayant un niveau équivalent de production est difficile et le passage à des brebis laitières de race Lacaune apparaît inenvisageable à certains dans les Pyrénées-Atlantiques. Sur l'initiative conjointe de la filière de sélection (CDEO), de la Chambre d'agriculture, du GDS (Groupement de Défense Sanitaire) et de l'IPL, il est prévu de constituer une banque d'agnelles, ainsi qu'un troupeau de brebis de réforme, présentant des garanties sanitaires et de production. Sur le plan psychologique, l'abattage est une mesure d'autant moins acceptable que l'agalactie contagieuse est perçue par les éleveurs non avertis des rechutes comme une affection dont les animaux guérissent cliniquement, et qu'elle ne présente pas de danger pour l'homme. Enfin sur le plan sanitaire,

les risques de recontamination du cheptel de renouvellement sont importants non seulement par le voisinage direct ou indirect dans les secteurs à forte prévalence, mais aussi par des introductions sans précautions d'animaux en provenance d'Espagne (ou de France s'il s'agit de chèvres) où l'agalactie contagieuse est présente sous forme enzootique [21].

Le recours à l'abattage total est donc devenu aujourd'hui très marginal dans la zone infectée française. Pourtant, son efficacité a été démontrée à plusieurs reprises, notamment en Béarn ou en Savoie sur des cheptels caprins infectés, où l'abattage a été suivi d'une disparition totale des foyers cliniques et d'un arrêt durable de la circulation de l'agent [10, 21].

L'abattage total de l'ensemble des élevages infectés recensés aujourd'hui dans les Pyrénées-Atlantiques (environ 220 cheptels, soit plus de 65 000 brebis) n'est pas applicable. La réduction des sources animales de mycoplasmes pourrait s'appuyer un abattage partiel dans les troupeaux infectés afin de tenter d'accélérer leur assainissement par la diminution du nombre d'animaux excréteurs. Le problème de cette réforme orientée est celui de la sélection des animaux à réformer du fait de l'existence de porteurs sains. En pratique, les réformes sont souvent faites sur la foi de la symptomatologie : à la fin de la lactation ou au début de la suivante, les animaux n'ayant pas récupéré leur potentiel de production ou nouvellement malades sont éliminés. La chute éventuelle du taux d'anticorps ne paraît pas renseigner objectivement sur le statut infectieux et contagieux, d'après les données disponibles. Un diagnostic bactériologique individuel exhaustif sur des troupeaux à grands effectifs n'est que difficilement envisageable financièrement et reste peu fiable. Ces réformes orientées restent donc imparfaites et aucune méthodologie officielle précise n'existe encore [7, 10, 21].

L'environnement, et peut-être certains animaux autres qu'ovins (bovins des troupeaux infectés, animaux sauvages ?...), peut aussi représenter une source de mycoplasmes (rappelons que les données scientifiquement éprouvées manquent sur ce sujet). Dans les cas d'abattage total, une désinfection doit être réalisée à l'aide d'antiseptiques usuels et être suivie d'un vide sanitaire. La récente mise en évidence de biofilms constitués par certaines souches de *M. agalactiae* sur des supports inertes renforce la nécessité d'accorder une attention accrue au nettoyage-désinfection de la machine à traire et des locaux d'élevage en général [7].

2.8.2.1.2- Limitation de la transmission

La limitation de la transmission entre adultes concerne d'abord la traite, par application des mesures classiques : vérification du bon fonctionnement de la machine à

traire, renouvellement régulier des manchons-trayeurs, antiseptie des trayons, limitation des phénomènes d'impact, voire ordre de traite des animaux sains aux animaux infectés,... Cependant, ces mesures, même rigoureusement appliquées, ne sont pas suffisantes car d'autres voies de transmission horizontale, directe ou indirecte, existent. L'une d'entre elles est aérophore et donc extrêmement difficile à contrôler. D'une manière générale, il est recommandé de limiter la densité animale. Les animaux en attente d'être réformés doivent être taris et isolés dans un autre bâtiment. La réalisation de lots (infectés *versus* présumés sains) reste soumise à l'utilisation d'outils de diagnostic performants et peu onéreux, qui font actuellement défaut à l'échelon individuel [10]. Rappelons de plus qu'en zone enzootique, nombre d'éleveurs cherchent au contraire à obtenir une infection de l'ensemble du troupeau (agnelles élevées avec des adultes présumées infectées vides ou tarées).

La transmission *post partum* de la mère aux jeunes peut être enrayée en les séparant dès la naissance et en les nourrissant avec du colostrum chauffé (56 °C pendant 20 minutes) ou du colostrum bovin, puis avec du lait pasteurisé. Une antibiothérapie *per os* est également possible en ateliers d'engraissement, en s'inspirant du modèle bovin (veaux) ; elle n'a jamais été évaluée à notre connaissance. Ces mesures sont coûteuses et difficiles à mettre en œuvre en pratique, surtout chez les ovins [7, 10].

L'intervention de vecteurs étant fortement suspectée au moins chez les caprins, il est recommandé d'appliquer les mesures de lutte contre les arthropodes et les acariens.

La diminution de la susceptibilité des animaux par des mesures non spécifiques paraît importante, puisqu'une bonne partie des cas cliniques surviennent dans des troupeaux présentant des défauts de conduite (ca sporadiques caprins surtout). Il faut donc optimiser la ration (dont les apports en vitamines A, E, sélénium,...) et le rationnement, la densité et l'ambiance en chèvrerie ou bergerie, l'état sanitaire global, le matériel et la technique de traite,... et limiter les stress [7]

2.8.2.2- Contrôle dans les régions infectées

Il concerne principalement *M. agalactiae* (ovins, caprins) et les départements à réglementation locale (64, 73, 74). Dans les régions d'enzootie, l'objectif est de circonscrire progressivement l'infection à certaines zones, puis, à terme, de viser un assainissement généralisé et durable. L'éradication n'est pas un objectif illusoire, comme le montrent les exemples béarnais et savoyards. Dans les Pyrénées-Atlantiques ce programme repose sur un

dispositif réglementaire préfectoral qui s'appuyait sur l'abattage partiel et des compensations financières.

2.8.2.2.1- Déclaration obligatoire des cas cliniques

La déclaration des suspicions cliniques est obligatoire sur la totalité du département pour tous les petits ruminants (arrêté préfectoral). Cette suspicion doit ensuite être confirmée par des analyses de laboratoire (analyse bactériologique par PCR et sérologie ELISA) et une enquête épidémiologique. Le texte rédigé par les experts réunis par l'Afssa (Anses) suite aux saisines n° 2009-SA-0156 et 2010-SA-0105, montre que la détection de la quasi-totalité des élevages infectés ces dernières années repose sur les analyses PCR réalisées sur le lait. Pourtant, après enquête épidémiologique, aucun signe clinique n'a été observé dans environ 20% de ces cheptels. Ces nouveaux cas sont donc détectés grâce aux analyses effectuées de manière systématique et non sur la base du signalement de cas cliniques par les éleveurs. Cette situation peut résulter d'un défaut de notification, mais aussi certainement de difficultés à identifier la maladie du fait de son caractère protéiforme ou discret, en particulier au début de son évolution dans un troupeau, d'où la nécessité de renforcer la sensibilisation des éleveurs et des vétérinaires.

2.8.2.2.2- Qualification des cheptels

La qualification annuelle exhaustive des cheptels de l'ensemble du département est fondée sur un dépistage par PCR sur lait de tank et, jusqu'à fin 2010, un sondage sérologique annuel par ELISA.

La sérologie est réalisée depuis 1987 avec des tests de type immunoenzymatique. En moyenne, les anticorps apparaissent 10 à 15 jours après l'infection ; ils persistent entre 40 et 45 mois sur un modèle expérimental réalisé à l'ENVT (Réf : poster Bergonier et al., 1997). Il n'existe pas de relation clairement identifiée entre les titres en anticorps et l'excrétion du germe (niveau et durée).

Il existe à l'heure actuelle deux coffrets éventuellement utilisables :

- le coffret fabriqué par IDEXX/POURQUIER. C'est un test ELISA indirect dont l'antigène est une protéine de fusion unique (P48). Il est utilisé dans les Pyrénées-Atlantiques depuis une dizaine d'années. Sa sensibilité est relativement faible (56% à 82% selon les sources), mais sa spécificité est excellente (99% à 100 %) [21].
- le coffret proposé par LSI. C'est un test ELISA indirect utilisant un antigène mycoplasmaïque total (souche espagnole), en cours d'évaluation au laboratoire de

l'Afssa Lyon et à l'ENVT-INRA UMR 1225. Les premiers essais semblent montrer que sa sensibilité est supérieure à celle du test IDEXX au moins dans certains troupeaux. Cependant, à ce jour, les travaux effectués sur des populations considérées comme indemnes démontrent que ce coffret présente des défauts de spécificité le rendant inutilisable en l'état (sans contrôle des présumés positifs) dans le cadre d'une prophylaxie de routine sur de grands effectifs [21].

La sérologie est actuellement (2010) mise en œuvre sur tous les cheptels ovins et caprins des Pyrénées-Atlantiques, quel que soit le type de production (lait ou viande). Ce sont les prélèvements réalisés pendant l'hiver pour le dépistage de la brucellose qui servent à la réalisation des tests ELISA. Les prises de sang sont normalement effectuées sur des animaux âgés de 12 mois ou plus et le nombre maximal d'ovins testés par cheptel est de 20.

Le statut du cheptel (positif, douteux ou indemne) a été défini jusqu'en 2010 après calcul d'un indice sérologique établi sur la base des résultats individuels. Cet indice sérologique avait été mis en place il y a environ 20 ans afin de minimiser l'impact du défaut de spécificité du test ELISA employé à l'époque, alors que la spécificité du test employé à l'heure actuelle est excellente. Le nombre maximal d'animaux soumis au dépistage de l'agalactie contagieuse (20 brebis) avait en particulier été fixé sur un objectif de tester 10% du cheptel. Depuis, ce chiffre n'a pas été réévalué, malgré l'augmentation de la taille des troupeaux. Il n'existe pas de recommandation précise concernant le choix des animaux à prélever. Pourtant, d'après les études de l'ENVT (D. Bergonier, communication personnelle), un plus grand pourcentage d'animaux séropositifs est observé chez les brebis adultes de 4 à 7 ans que chez les antenaises (animaux d'un à deux ans) et les agnelles (animaux de moins d'un an). L'absence de recommandations dans l'arrêté préfectoral quant aux critères de choix des animaux à prélever peut être à l'origine d'un biais d'échantillonnage et donc d'une sous-estimation potentielle de la prévalence réelle.

Enfin, le dépistage de l'agalactie contagieuse par sérologie est le seul moyen envisageable pour les cheptels allaitants, pour les lots d'ovins hors lactation ou pour les mâles. Il est par ailleurs un moyen nécessaire pour les producteurs fermiers.

Une réflexion existe aujourd'hui, en préparation de la campagne 2011, sur la façon de valoriser la complémentarité existant entre le dépistage sérologique en cheptel laitier et la surveillance devenue régulière par PCR sur le lait. Les modalités d'utilisation de la sérologie Elisa sont également en cours de redéfinition.

Le diagnostic direct de l'agalactie contagieuse repose sur la recherche par PCR en temps réel de *M. agalactiae*. L'analyse pourrait être effectuée sur diverses matrices, mais

c'est sur du lait de tank qu'elle est réalisée. Le test moléculaire est effectué après deux étapes de culture de cinq à sept jours, culture suivie d'une extraction des acides nucléiques. Une PCR spécifique de *M. agalactiae* est ensuite réalisée. Le résultat final est qualitatif en fonction du « cutting threshold » (Ct) obtenu (positif si $Ct < 35$, douteux si $35 < Ct < 40$, et négatif si $Ct > 40$).

Le diagnostic direct par PCR est réalisé sur le lait de tank d'une exploitation ou bien sur des mélanges de laits de tank de 10 ou 15 cheptels, ou encore sur des laits de citerne pouvant représenter la production de 15 à 40 troupeaux. Les laits de tank sont prélevés, selon les types d'élevage et les circonstances, par les techniciens du GDS, par les vétérinaires sanitaires, par les techniciens de laiterie ou encore par les éleveurs. Le rythme des contrôles et le type de prélèvements sont fixés en fonction de la zone de localisation du cheptel. Les moyens (traduits en nombre de tests et types d'échantillons analysés) sont renforcés dans les zones où la probabilité d'apparition de nouveaux foyers est la plus forte. Par exemple, sur la campagne 2009-2010, les dépistages étaient :

- Zone à risque : 4 tests sur lait de tank, 3 sur mélange de laits de tank (10 cheptels)
- Périmètre de suivi renforcé : 4 tests sur lait de tank, 4 sur mélange de laits de tank (10 cheptels)
- Zone tampon : 2 sur lait de tank, 6 sur mélange de laits de tank (15 cheptels)
- Zone indemne : 4 sur lait de citerne (de 10 à 40 cheptels selon la tournée)

L'utilisation de la PCR sur lait selon les modalités définies pour la campagne 2009 – 2010 semble répondre de manière satisfaisante à l'objectif d'une identification rapide des nouveaux foyers. Le même type de dispositif sera reconduit pour 2010-2011.

2.8.2.2.3- Gestion des cheptels infectés

La gestion des cheptels infectés a largement été développée précédemment (paragraphe 2.8.2.1). Nous rappellerons juste que l'abattage total était conseillé (et subventionné) dans l'ensemble de département des Pyrénées-Atlantiques, mais qu'il n'est aujourd'hui appliqué qu'en zone indemne.

L'isolement des cheptels infectés repose sur la mise en place d'un certain nombre de mesures de biosécurité, en pâtures ainsi qu'à l'entrée de l'exploitation. Elles sont décrites clairement dans l'arrêté préfectoral et font l'objet de contrôles par une grille d'évaluation de l'isolement. La consigne principale consiste en la pose de doubles clôtures dans les pâtures mitoyennes d'autres exploitations. Les éleveurs bénéficient d'aides financières pour l'achat de ces clôtures.

2.8.2.2.4- Gestion des transactions et des mouvements

d'animaux

La contamination d'un cheptel indemne peut, en premier lieu, être consécutive à l'introduction (achat, prêt, pension...) d'un sujet infecté. Elle peut également se faire à la faveur de mélanges de troupeaux lors de transhumance, par exemple, ou à l'occasion de contacts plus ponctuels sur des parcours communs pour se rendre dans les pâtures, lors de transports ou encore lors de rassemblements (foires, centres de pesée, marchés...). Ces dernières modalités paraissent plus fréquentes aujourd'hui. La gestion des transactions et des mouvements d'animaux en fonction des qualifications est donc primordiale.

Les mouvements d'animaux sont très nombreux et peuvent concerner la totalité du troupeau (transhumance estivale), des lots entiers (exemple de la mise en pension hivernale des agnelles), ou seulement quelques individus (prêt de béliers, remplacements d'agneaux morts, retour d'animaux non vendus au marché...). S'y ajoutent les déplacements journaliers entre la bergerie et les pâtures, en empruntant souvent des chemins communs à plusieurs exploitations. Les circuits d'animaux sains et d'animaux infectés se croisent régulièrement, au niveau du transport, des centres de rassemblement ou des marchés. Certains de ces déplacements (principalement la transhumance estivale) sont bien identifiés, soumis à des règles et contrôlés. D'autres sont méconnus, et ne sont donc soumis à aucune règle. Enfin, une troisième catégorie est mieux identifiée aujourd'hui (retours de marché vers le siège de l'exploitation, circuit des bétailières transportant des animaux atteints vers l'abattoir dans le cadre d'abattages partiels...), mais se pose peut-être la question de l'observance des recommandations. La connaissance des statuts sanitaires de troupeaux doit pourtant permettre de gérer leurs mouvements, en proposant éventuellement des mélanges en pâturages collectifs après tarissement, des transhumances en pâturages-lazarets isolés ou des interdictions de transhumance.

En ce qui concerne les transactions d'animaux, la réalisation de sérologies lors d'achats est essentielle. De plus, les achats devraient être réalisés en fonction des statuts des différentes exploitations vis-à-vis de l'agalactie contagieuse. Enfin, toute introduction d'animaux dans un cheptel devrait être, selon divers auteurs, précédée d'une quarantaine [7, 10, 21].

Partie expérimentale

1- Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les connaissances actuelles sur la virulence comparée de PG₂ (souche internationale de référence) et des souches sauvages isolées des principaux pays touchés par l'Agalactie contagieuse sont insuffisantes. On ne sait pas, par exemple, quel est précisément le pouvoir pathogène des souches de *Ma* ponctuellement isolées à la fin des années 1980 dans de nombreux élevages ovins laitiers de la région de Roquefort, élevages n'ayant jamais présenté de symptômes d'agalactie. De même, les connaissances actuelles, dans le domaine vaccinal, sur le pouvoir immunogène de diverses préparations antigéniques (antigènes totaux de différentes souches, protéines externes, membranes, protéines spécifiques...) sont très lacunaires.

L'une des étapes à franchir pour apporter des réponses à ces questions est de disposer d'un modèle expérimental sur l'animal cible (hôte naturel) permettant, après inoculation, de reproduire au moins l'infection, si ce n'est la maladie, aussi proches que possible de l'Agalactie contagieuse naturelle. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer un protocole standardisé d'inoculation induisant, après une infection générale, la modification quantifiable de marqueurs cliniques et biologiques utilisables dans des essais d'inoculation (scores cliniques, production laitière, fréquence et voies d'excrétion, paramètres sérologiques...). Ces deux derniers groupes de critères font l'objet du présent travail, avec une étude plus poussée des cinétiques sérologiques ELISA. Ce dernier fait partie d'une expérimentation plus large scindée en deux thèses.

Les 4 groupes de mots-clefs définissant nos objectifs sont donc : représentativité par rapport à l'agalactie naturelle, infection générale, protocole standardisé et modifications quantifiables. Ils vont guider le choix de nos méthodes.

2- Matériel et méthodes

2.1- Les animaux

2.1.1- Description des animaux

Les animaux utilisés dans cette étude étaient tous des ovins femelles de race Lacaune provenant du même cheptel d'origine dans l'Aveyron (pour cause de cessation). Lors de leur réception à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, les 28 brebis étaient gravides et se trouvaient dans leur dernier tiers de gestation. Enfin, aucune agnelle n'a participé à cette expérience : toutes les femelles avaient un rang de lactation supérieur ou égal à 2.

2.1.2- Période pré-inoculation

2.1.2.1- Logement

Les brebis furent placées dans les locaux expérimentaux de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) pour la période pré-expérimentale. Elles furent réparties dans 5 box rectangulaires de 20m² par groupes de 4 ou 5 brebis. Le sol des box étaient constitué de litière accumulée et de paille sur du béton.

2.1.2.2- Alimentation

Pendant la période pré-expérimentale, les brebis recevaient une ration constituée de foin *ad libitum* et de concentré. Le foin était distribué matin et soir dans l'auge après que les refus aient été enlevés. 500g de concentré de production étaient donné le matin.

Les agneaux étaient nourris avec le lait de leur mère qu'ils consommaient directement au pis selon leurs besoins. Seul un agneau ayant participé à l'expérience (l'agneau 005) a reçu quelques biberons de lait reconstitué lors de ses premiers jours de vie car sa mère (2014) ne le laissait pas téter et qu'il était faible. Les agneaux 007 et 008 de la brebis 1014 avaient également été alimentés au biberon, mais ils ont été écartés de l'expérience car leur mère était atteinte de mammite gangréneuse. A partir d'environ un mois d'âge, les agneaux mangeaient également du foin des brebis et un peu de concentré starter.

2.1.2.3- Mises bas

Sur les 28 brebis gravides reçues au départ, une (1010) est morte des suites d'une toxémie de gestation sans avoir mis au monde d'agneau. Toutes les autres ont mis bas un ou deux agneaux. Dans le tableau 9 et le graphique de la figure 4 sont présentées les dates de mise-bas. La première naissance a eu lieu le 09 octobre 2008 et la dernière le 22 novembre 2008 : il s'est donc écoulé 45 jours entre la première et la dernière mise bas. En un mois (entre le 10 octobre et le 10 novembre), 23 brebis ont mis bas sur 26, soit 88%. Enfin, 77% des naissances se sont produites en 25 jours (entre le 10 octobre et le 3 novembre).

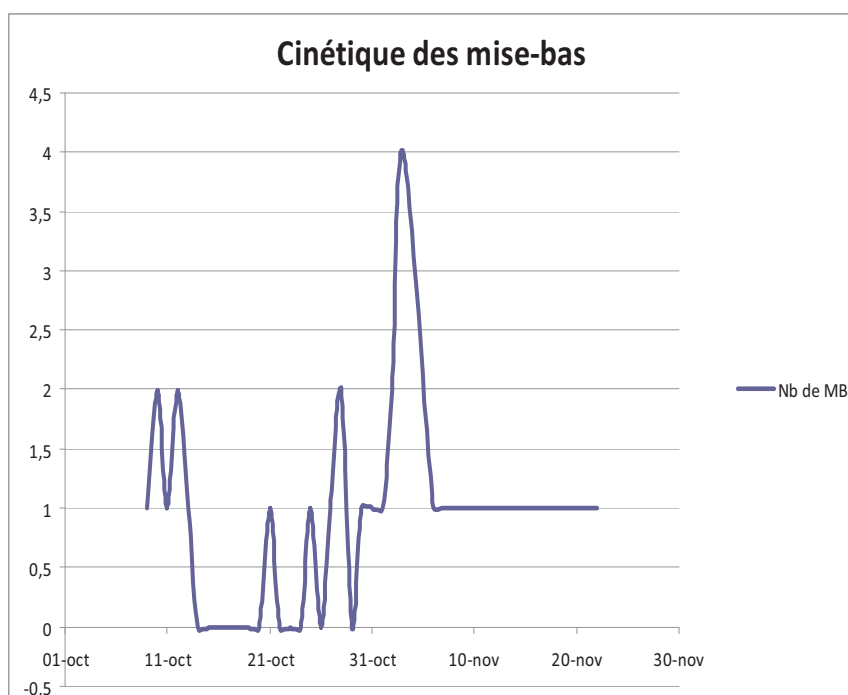


Figure 4 : Cinétique des mise-bas

Tableau 9 : Dates des mise-bas

Date	Nombre de mise-bas
09-oct	1
10-oct	2
11-oct	1
12-oct	2
13-oct	1
21-oct	1
25-oct	1
27-oct	1
28-oct	2
30-oct	1
31-oct	1
01-nov	1
02-nov	2
03-nov	4
06-nov	1
07-nov	1
10-nov	1
15-nov	1
22-nov	1

2.1.2.4- Soins

A leur arrivée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, les animaux qui avaient des problèmes de pieds ont fait l'objet d'un parage.

Au cours de la période pré-expérimentale (c'est-à-dire pré-inoculation), les brebis ont fait l'objet d'une surveillance régulière. Un opérateur passait les voir trois fois par jour pour surveiller leur état de santé en particulier l'absence de boiterie, de signes oculaires et mammaires.

A chaque mise-bas, les agneaux étaient systématiquement identifiés à l'aide de boucles auriculaires numérotées. Ils étaient ainsi numérotés par ordre croissant en fonction de leur date de naissance. Les nouveau-nés faisaient également l'objet d'une désinfection de l'ombilic avec une solution iodée. Nous vérifiions aussi leur aptitude à téter et leur bonne acceptation par leur mère. Nous aidions les plus faibles à téter le colostrum et à expulser le méconium. Dans les jours suivants, nous nous assurons que les deux hémimamelles soient tétées et qu'il n'y ait pas de déséquilibre des pis.

Pendant cette période, quelques brebis ont été malades et ont dû subir un traitement. L'intégralité des traitements mis en œuvre, les raisons de ces traitements ainsi que leurs résultats sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10 : signes cliniques des brebis malades, traitements mis en places, résultats cliniques et conséquences

Brebis	Pathologie	Traitement	Résultat	Conséquence exclusion
1010	Toxémie de gestation	Dexamédium(induction parturition) energidex® et cofacalcium®	Morte	oui
1014	mammite gangréneuse	Dimazon®, dexamédium®, hemoced® et spirovet®	Echec=>Euthanasie	oui
2039	Mammite à Droite	spirovet®	Guérison clinique	oui
007	T°=41.3, couchée et levée difficile	Cobactan®+Dexamédium®	Guérison clinique	oui
1037	Mammite à Gauche	Mammite à Staphylocoques=>traitement à l'iode des lésions+A180®	Guérison clinique	non
036	Mammite à Droite	dexamédium® Spirovet® puis Cobactan® puis A180®	Guérison clinique	oui
2014	Mammite à Gauche		Guérison clinique	non

De plus, un examen clinique rigoureux, particulièrement de la mamelle et des bactériologies sur le lait de chaque hémi-mamelle ont été réalisés sur toutes les brebis avant le début de l'expérience. Les résultats de ce travail sont résumés dans le tableau de l'annexe 3.

2.1.3- Vérification de la négativité vis-à-vis de *Mycoplasma agalactiae*

Avant de débiter réellement l'expérience, c'est-à-dire de constituer les lots et de procéder à l'inoculation, nous nous sommes assuré de la négativité des brebis vis-à-vis de *Ma* par différentes méthodes.

En premier lieu, nous avons réalisé des sérologies ELISA (P48, trousse Idexx-Pourquier) dès l'arrivée des brebis à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

De plus, nous avons effectué une recherche de *Ma* sur le lait de chaque hémi-mamelle, dans les cavités nasales et dans les oreilles de toutes les brebis.

Tous les résultats étaient négatifs.

2.1.4- Constitution des lots

2.1.4.1- Présentation des lots

Sur les 28 brebis livrées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, deux sont mortes pendant la période pré-inoculation. Les 26 brebis restantes et leurs agneaux ont été répartis en 5 groupes homogènes. Notre travail porte sur le suivi de trois groupes de brebis :

- Groupe témoin négatif : inoculation avec du milieu de culture pour mycoplasmes SP4-HS (sans acétate de thallium)

- Groupe 1 : inoculation avec la souche PG2 à 10^3 UFC

- Groupe 2 : inoculation avec la souche PG2 à 10^5 UFC

PG2 est la souche de référence internationale de *Ma*.

2.1.4.2- Critères de constitution des lots

Les critères de constitution des lots avaient été décidés, avant la réception des animaux.

Tout d'abord, tous les animaux reçus constituaient déjà un lot relativement homogène puisqu'ils étaient tous de la même espèce (ovins), de la même race (Lacaune), de la même provenance (même élevage d'origine avec les mêmes conditions d'alimentation, de logement et de conduite de troupeau), du même sexe (femelles) et d'âges assez proches (entre 2 et 6 ans).

Ensuite, il était convenu de ne retenir que des brebis des deux premiers cycles de mise bas (sur IA et 1^{er} retours) pour les groupes 1 et 2 de manière à avoir des stades physiologiques homogènes.

De plus, les animaux présentant des mammites subcliniques furent placés préférentiellement dans le lot témoin négatif afin d'éviter au maximum les co-infections mammaires dans les lots PG2. Les brebis saines furent placées dans les autres lots en neutralisant les facteurs de variation connus et renseignés de l'expression clinique (« stratified random sampling ») : stade de lactation et affections intercurrentes éventuelles (ne constituant pas des critères d'exclusion). Les productions laitières initiales ne furent pas connues assez tôt pour être intégrées.

Tableau 11 : récapitulatif des critères de constitution des lots et lots définitifs

Brebis	Date Mise bas	Numéros agneaux	Pathologie clinique ou subclinique détectée en période pré-inoculation	Date moyenne de MB	Lot
2039	10/10/08	10	Mammite à D	28 octobre	Lazaret1 : autre étude
5049	25/10/08	15			
5054	30/10/08	21			
1027	03/11/08	025-026			
2035	10/11/08	35			
3019	10/10/08	3		23 octobre	Lazaret 2 : autre étude
4002	12/10/08	012-013	SCN à droite		
2004	28/10/08	18			
4006	01/11/08	23			
7	03/11/08	027-028	T°=41.3, levée difficile mais guérison clinique		
1037	11/10/08	4	Mammite à G	26 octobre	Groupe 1 : PG2 10 ³ UFC
3044	27/10/08	016-017			
206	31/10/08	22			
1059	02/11/08	30			
2015	06/11/08	032-033	SCN bilatéral		
3012	12/10/08	11		30 octobre	Groupe 2 : PG2 10 ⁵ UFC
3065	28/10/08	019-020			
1067	02/11/08	24	SCN à gauche		
2023	03/11/08	31			
3004	07/11/08	34	SCN à gauche		
2027	12/10/08	14	Mammite à D, E. coli bilatéral	30 octobre	Témoin
3024	13/10/08	001-002	E. coli à droite		
2014	21/10/08	006-005	Mammite à G, E. coli à gauche et SCN à droite		
1033	03/11/08	29	SCN à droite		
2049	15/11/08	36	Non testée car agnelage tardif		
2010	22/11/08	037-038	Non testée car agnelage tardif		

UFC : Unités Formant Colonies

SCN : staphylocoques à coagulase négative

E. coli : colibacilles

D : droite (concerne l'hémi-mamelle droite)

G : gauche (concerne l'hémi-mamelle gauche)

T° : température rectale

2.1.5- Période post-inoculation

2.1.5.1- Logement et soins

Aussitôt les lots réalisés et juste avant l'inoculation, les différents lots de brebis furent séparés géographiquement pour éviter tout contact entre les groupes et ainsi empêcher des contaminations.

Les animaux du lot témoins furent placés dans un parc d'un premier bâtiment de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Les brebis et agneaux des groupes 1 et 2 furent placés dans 2 boxes distincts d'un second bâtiment de l'ENVT. Les deux bâtiments sont parfaitement indépendants ; les animaux étaient éloignés dans l'espace.

En outre, le matériel utilisé pour nourrir et soigner les animaux, curer les boxes, réaliser les prélèvements et les examens était différent pour chaque groupe. De même, les animaliers chargés de s'occuper des animaux étaient différents.

2.1.5.2- Alimentation

L'alimentation pendant la période post-inoculation était la même que pendant la période pré-inoculation ; elle était la même pour les différents lots.

2.2- Inoculums et inoculation

2.2.1- Préparation des inoculums

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 : 10³ et 10⁵ 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 10³ et 10⁵ UFC.

2.2.2- Inoculation

L'inoculation de toutes les brebis a eu lieu le matin du 17/11/2008. Les premières brebis inoculées furent celles du lot témoin puis celle du groupe 1 et enfin celles du groupe 2. Les aliquotes de titre connu conservées à -80°C furent décongelés puis dilués en milieu SP4-HS (sans acétate de thallium).

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.

2.3- Réalisation des prélèvements

2.3.1- Prélèvements pré-inoculation

Les prélèvements effectués avant l'inoculation furent les suivants :

- Une prise de sang par brebis à la veine jugulaire le jour de leur réception (2 aliquotes) : réalisation de sérologie ELISA *Ma* (et Border disease + Visna Maedi) ;
- Un prélèvement aseptique de lait de chaque hémimamelle : ensemencement sur gélose au sang et en mélange des deux hémimamelles en bouillon mycoplasme SP4-HS
- Ecouvillonnages nez - oreilles : 1 écouvillon par site.
- Une prise de sang sur tube sec sur les agneaux avant inoculation.

2.3.2- Prélèvements post-inoculation

2.3.2.1- Sur les mères

La fréquence des prélèvements était de 3 fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi matins après séparation des couples mères-agneaux la veille au soir).

L'ordre de prélèvement était toujours le même : d'abord les témoins négatifs puis le groupe 1 et enfin le groupe 2. Le matériel utilisé pour les prélèvements était propre à chaque lot et les personnes chargées des prélèvements changeaient de bottes, de combinaison et se lavaient soigneusement les mains entre les lots. Ces mesures visaient préserver les animaux d'une contamination éventuelle entre les lots.

Les personnes effectuant les prélèvements étaient toujours les mêmes (le professeur D. Bergonier, A. Bressolin et moi-même) afin d'avoir une bonne répétabilité.

Le premier prélèvement réalisé était un prélèvement aseptique de lait sur chaque hémimamelle de toutes les brebis. Ce dernier était obtenu après élimination des premiers jets (utilisés pour des comptages cellulaires pour une autre étude) et désinfection du trayon par de l'alcool à 70°. Le lait ainsi recueilli était utilisé pour des ensemencements en frais :

- une bactériologie classique : ensemencement une fois par semaine, le lundi ;
- une bactériologie mycoplasmaïque : ensemencement 3 fois par semaine (bouillons, puis congélation des laits à -80°C).

Le deuxième type de prélèvement était des échantillons sanguins : 1 tube sec et 1 tube EDTA par brebis.

2.3.2.2- Sur les agneaux

Un tube sec était prélevé une fois par semaine (le lundi matin). A la fin de l'expérience, un tube sec terminal a été récolté le plus tard possible avant euthanasie.

2.4- Bactériologie

Les laits ou sangs étaient mis en culture dans les 3 heures suivant les prélèvements, à la fois pour analyse bactériologique classique (gélose au sang), et pour analyse mycoplasmaïque. Pour cette dernière, les laits étaient ensemencés en bouillon mycoplasme SP4-HS (dilutions 10^{-1} et 10^{-2}) et mis à l'étuve pendant 3 jours. Ces cultures étaient ensuite étalées sur gélose mycoplasme (SP4 également) et placées à l'étuve pendant 4 jours. Elles étaient ensuite observées à la loupe binoculaire. Les cultures négatives ont donné lieu avec des témoins positifs, à des PCR sur bouillon enrichis à l'aide d'amorces *polC*. L'identification d'espèce des bactéries non mycoplasmaïques était réalisée selon des techniques conventionnelles (galeries d'identification miniaturisées API).

2.5- Sérologies

La trousse sérologique ELISA Idexx-Pourquier a été utilisée selon les recommandations du fabricant. L'antigène utilisé est la protéine P48, protéine membranaire externe de *Ma*.

L'interprétation des résultats a été réalisée avec deux types de seuils : ceux du fabricant (60% et 50% de la positivité du sérum contrôle positif de la trousse respectivement pour les seuils positifs et douteux) et celui qui est utilisé dans les Pyrénées-Atlantiques pour la campagne de prophylaxie 2011, après validation par l'AFSSA (Ansès) Lyon, le GDS 64 et l'ENVT : 30%.

Les sérums ont été traités dans deux laboratoires (A et B).

2.6- Analyse des données

Nous avons tout d'abord analysé les données des bactériologies non spécifiques et mycoplasmiques indépendamment, puis nous avons croisé ces résultats pour rechercher d'éventuelles associations entre l'excrétion lactée de *Ma* et d'autres germes mammaires.

Ensuite, les données sérologiques des laboratoires A et B ont été saisies sur Excel et traitées à l'aide de ce logiciel. Ainsi, tous les tableaux, courbes et résultats statistiques (moyennes, médianes, écarts-types, calcul de coefficients de corrélation et utilisation du test de Student...) présentés dans la suite de ce document ont été réalisés à l'aide de ce logiciel.

Enfin, une partie des résultats consiste en l'étude de la variabilité inter-laboratoires, c'est-à-dire de la reproductibilité des tests sérologiques. Pour cette partie, nous nous sommes appuyés sur les définitions suivantes.

La reproductibilité ne doit pas être confondue avec la répétabilité qui est l'étroitesse de l'accord entre les résultats de mesurages successifs du même mesurande (ou échantillon), mesurages effectués avec l'application de la totalité des mêmes conditions de mesure. Les conditions de répétabilité comprennent : un même mode opératoire, un même observateur, un même instrument de mesure utilisé dans les mêmes conditions, un même lieu, une répétition durant une courte période de temps.

Nous allons citer deux définitions de la reproductibilité : celle du VIM (Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie (2^o édition 1993)) et celle de la norme ISO 3534-1. Les différentes définitions sont très proches et compatibles mais pas parfaitement accordées.

D'après le VIM, la reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages du même mesurande, mesurages effectués en faisant varier les conditions de mesure. Les conditions que l'on fait varier peuvent comprendre : le principe de mesure,

méthode de mesure, l'observateur, l'instrument de mesure, l'étalon de référence, le lieu, les conditions d'utilisation, ou le temps. La reproductibilité peut s'exprimer quantitativement à l'aide des caractéristiques de dispersion des résultats.

La définition ISO 3534-1 est basée sur celle de la fidélité. La fidélité est l'étroitesse d'accord entre des résultats indépendants obtenus sous des conditions stipulées. La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est exprimée en termes d'infidélité et est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais. Une fidélité moindre est reflétée par un plus grand écart-type. La reproductibilité est la fidélité sous des conditions de répétabilité (conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents) [42].

3- Résultats

3.1- Résultats bactériologiques

Tous les examens bactériologiques effectués sur le sang des brebis se sont avérés négatifs : aucun mycoplasme n'a pu être isolé. Les résultats exposés dans cette partie traitent donc uniquement des bactériologies effectuées sur le lait des brebis.

3.1.1- Bactériologies mycoplasmiques

Toutes les bactériologies des brebis du lot témoin négatif furent négatives.

Les résultats des bactériologies effectuées sur le lait des deux héli-mamelles de chaque brebis du groupe 1 sont résumés dans le tableau suivant (tableau 12). Ils permettent de répartir les brebis en 2 sous-groupes en fonction des caractéristiques de leur excrétion mycoplasmique :

- excrétion précoce et durable sur 1 ou 2 héli-mamelles: brebis 2015 et 3044
- excrétion tardive et éphémère sur une seule héli-mamelle : brebis 1037, 1059 et 206

Tableau 12 : résultats des bactériologies mycoplasmiques sur le lait des brebis du lot 1

	17/11	19/11	21/11	24/11	26/11	28/11	01/12	03/12	05/12	08/12	10/12	12/12	15/12
	J0	J2	J4	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
1037G													
1037D													
3044G													
3044D													
2006G													
2006D													
1059G													
1059D													
2015G													
2015D													

: Bactériologie négative : aucun mycoplasme isolé dans le lait
 : Bactériologie positive : mycoplasmes isolés à la 1^{ère} dilution
 : Bactériologie fortement positive : mycoplasmes à la 2^{ème} dilution
 G : Hémi-mamelle gauche
 D : hémi-mamelle droite

Les résultats bactériologiques du groupe 2, résumés dans le tableau 13, montrent le même type de différenciation entre les brebis que le groupe 1. En effet, 3 types de profils d'excrétion étaient visibles :

- Excrétion précoce et durable sur 1 ou 2 hémi-mamelle : brebis 3004
- Excrétion tardive et éphémère sur une seule hémi-mamelle : brebis 3012, 3065 et 1067
- Absence d'excrétion : brebis 2023.

Tableau 13 : résultats des bactériologies mycoplasmiques sur le lait des brebis du lot 2

	17/11	19/11	21/11	24/11	26/11	28/11	01/12	03/12	05/12	08/12	10/12	12/12	15/12
	J0	J2	J4	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
3012G													
3012D													
3065G													
3065D													
1067G													
1067D													
2023G													
2023D													
3004G													
3004D													

: Bactériologie négative : aucun mycoplasme trouvé dans le lait
 : Bactériologie positive : mycoplasmes isolés à la 1^{ère} dilution
 : Bactériologie fortement positive : mycoplasmes à la 2^{ème} dilution
 G : Hémi-mamelle gauche
 D : hémi-mamelle droite

Les brebis des groupes 1 et 2 se répartissaient donc en 3 groupes quel que soit le titre de leur inoculum, c'est-à-dire quel que soit leur groupe initial : des brebis présentant une excrétion précoce et durable bilatérale (3 brebis), des animaux ayant une excrétion tardive et éphémère sur une seule héli-mamelle (6 brebis) et enfin une brebis n'ayant jamais excrété de mycoplasme pendant la durée de cette expérience.

Au total, les brebis à excrétion tardive ont présenté leurs premières positivités entre J₁₈ et J₂₅. Elles n'ont été positives qu'une fois.

3.1.2- Bactériologies non spécifiques

Dans tous les groupes, les germes les plus souvent isolés dans le lait étaient des staphylocoques à coagulase négative : 4 brebis du lot témoin, 2 brebis du groupe 1 et 2 brebis du groupe 2, donc sur 8 brebis au total. Ainsi, 66,7% des brebis groupe témoin ont donc excrété au moins une fois des staphylocoques à coagulase négative, contre 40% des brebis des groupes 1 et 2 (soit 50% des brebis tous groupes confondus).

Escherichia coli a été retrouvé dans le lait d'une brebis (2014) du groupe témoin (16,7%), une brebis (3044) du groupe 1 (20%) et aucune brebis du groupe 2, soit sur 12,5% de toutes les brebis.

De manière plus ponctuelle, un staphylocoque à coagulase positif et un streptocoque n'ont été isolés qu'une seule fois.

Deux brebis du groupe 1 (1037 et 1059) et trois brebis du groupe 2 (3012, 3065 et 2023) avaient une mamelle saine avec toutes leurs bactériologies non spécifiques négatives.

Parmi les brebis ayant eu au moins une bactériologie positive sur au moins une de leur deux héli-mamelles, plusieurs catégories d'animaux étaient présentes :

- certains animaux n'ont eu une bactériologie positive que ponctuellement sur une seule héli-mamelle : 1033 et 2027 dans le groupe témoin et 2006 dans le groupe 1.
- d'autres animaux au contraire ont été positifs à plusieurs reprises sur une ou deux héli-mamelle (avec la même bactérie ou avec des bactéries différentes) : 2010, 2014 et 2049 dans le groupe témoin, 3044 et 2015 dans le groupe 1 et enfin 1067 et 3004 dans le groupe 2. Dans les groupes 1 et 2, les brebis appartenant à cette catégorie sont aussi celles qui ont eu les bactériologies mycoplasmiques les plus fortement et durablement positives (sauf la brebis 1067 à gauche).

Tableau 14 : Résultats des bactériologies non spécifiques réalisées sur le lait des brebis du lot témoin négatif

Dates Brebis	07/11	17/11	24/11	01/12	08/12	15/12
	J-10	J0	J7	J14	J21	J28
2010 G	0	0	SCN	SCN	SCN	SCN
2010 D	0	0	SCN	SCN	SCN	SCN
3024 G						
3024 D						
2014 G	E. coli		E. coli		E. coli	E. coli
2014 D	SCN	SCN	SCN	SCN	SCN	SCN
1033 G						
1033 D	SCN					
2027 G				Strep. Sp.		
2027 D						
2049 G	0	SCN				
2049 D	0	SCN	SCN	SCN	SCN	SCN

G : lait de l'hémi-mamelle gauche ; D : lait de l'hémi-mamelle droite ; 0 : absence de donné car non encore suitée ; SCN : Staphylocoque Coagulase Négatif ; E. coli : *Escherichia coli* ; Strep. Sp. : *Streptococcus* spp. ; : Bactériologie mycoplasmiqum négative : aucun mycoplasme trouvé dans le lait

Tableau 15 : Résultats des bactériologies non spécifiques et myoplasmiques réalisées sur le lait des brebis du lot 1

	07/11	17/11	24/11	26/11	28/11	01/12	03/12	05/12	08/12	10/12	12/12	15/12
	J-10	J0	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
1037G												
1037D												
3044G		E.coli	E.coli			E.coli						
3044D									SCN			
2006G									SCP			
2006D												
1059G												
1059D												
2015G	SCN											
2015D	SCN	SCN	SCN			SCN			SCN			SCN

G : lait de l'hémi-mamelle gauche ; D : lait de l'hémi-mamelle droite ; SCN : Staphylocoque Coagulase Négatif ; SCP : Staphylocoque Coagulase Positif ; E. coli : *Escherichia coli* ;

: Bactériologie négative : aucun mycoplasme trouvé dans le lait

: Bactériologie positive : mycoplasmes isolés à la 1^{ère} dilution

: Bactériologie fortement positive : mycoplasmes à la 2^{ème} dilution

Tableau 16 : Résultats des bactériologies non spécifiques et mycoplasmiques réalisées sur le lait des brebis du lot 2

	07/11	17/11	24/11	26/11	28/11	01/12	03/12	05/12	08/12	10/12	12/12	15/12
	J-10	J0	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
3012G												
3012D												
3065G												
3065D												
1067G	SCN		SCN			SCN			SCN			
1067D												
2023G												
2023D												
3004G	SCN	SCN	SCN			SCN				SCN		
3004D												

G : lait de l'hémi-mamelle gauche ; D : lait de l'hémi-mamelle droite ; SCN : Staphylocoque Coagulase Négatif ;

□ : Bactériologie négative : aucun mycoplasme trouvé dans le lait

■ : Bactériologie positive : mycoplasmes isolés à la 1^{ère} dilution

■ : Bactériologie fortement positive : mycoplasmes à la 2^{ème} dilution

3.2- Résultats sérologiques

3.2.1- Reproductibilité : étude de la variabilité inter-laboratoires

3.2.1.1- Etude de la variabilité inter-laboratoire brebis par brebis

Dans notre étude, les mêmes échantillons ont été analysés avec le même kit (mais pas le même lot de kit), c'est-à-dire par la même méthode, par deux laboratoires différents : le laboratoire B d'une part et A d'autre part. Les échantillons ont été analysés par des personnes différentes et à des moments différents. Le laboratoire B est un laboratoire de diagnostic auquel les vétérinaires praticiens font couramment appel, le laboratoire A est un laboratoire de recherche.

Comme nous l'avons dit précédemment, nous avons utilisé deux seuils :

- celui du fabricant (négatif si inférieur à 50%, douteux si entre 50 et 60%, positif si supérieur à 60%)
- celui qui a été validé dans les Pyrénées Atlantiques (cf discussion) de 30%.

- **Brebis 1037**

Tableau 17 : Comparaison des sérologies de la brebis 1037 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	1	0,3	-	-
J2	0,9	0,1	-	-
J4	2,4	0	-	-
J7	1,2	0,2	-	-
J9	2,4	0,6	-	-
J11	14,8	11,1	-	-
J14	55,3	36,2	-/+	-
J16	52,4	42,1	-/+	-
J18	66,9	44,1	+	-
J21	57,5	33,5	-/+	-
J23	64	41,6	+	-
J25	66,7	64	+	+
J28	80,1	66	+	+
Moy	35,82	26,14		
Min	0,9	0		
Max	80,1	66		

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

— Dépassement du seuil de 30%

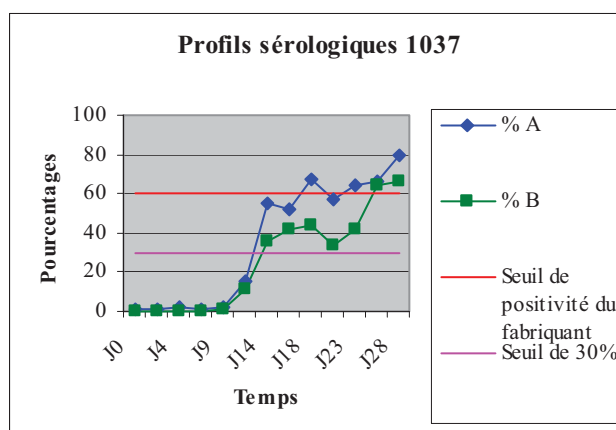


Figure 5 : Profils sérologiques de la brebis 1037

La brebis 1037, est considérée comme négative par les deux laboratoires jusqu'à J11 inclus. L'écart moyen entre les valeurs est de 1,73%. A J25 et J28, elle est déclarée positive par les 2 laboratoires même si les pourcentages donnés par le laboratoire A restent très supérieurs à ceux du laboratoire B (de 8,9% en moyenne)

Entre J14 et J23, les pourcentages et les statuts attribués par les laboratoires diffèrent. Les pourcentages du laboratoire B sont inférieurs à ceux du laboratoire A (de 19,52% en moyenne).

La moyenne des résultats du laboratoire A est supérieure de 9,68% à celle des résultats du laboratoire B.

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,971.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 25,90.

Au seuil de 30%, comme à celui de 50%, cette brebis est positive à partir de J14 et jusqu'à la fin de l'expérience.

- **Brebis 3044 :**

Tableau 18 : Comparaison des sérologies de la brebis 3044 par le laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	1,1	1,3	-	-
J2	1,1	0,4	-	-
J4	1,3	0,4	-	-
J7	1,1	0,7	-	-
J9	1,3	0,4	-	-
J11	1,3	0,4	-	-
J14	1,8	0,4	-	-
J16	1,8	0,8	-	-
J18	2,3	1,7	-	-
J21	4,9	34,3	-	-
J23	14,4	9,8	-	-
J25	46,1	34,2	-	-
J28	74,6	51,8	+	+/-
Moy	11,78	10,51		
Min	1,1	0,4		
Max	74,6	51,8		

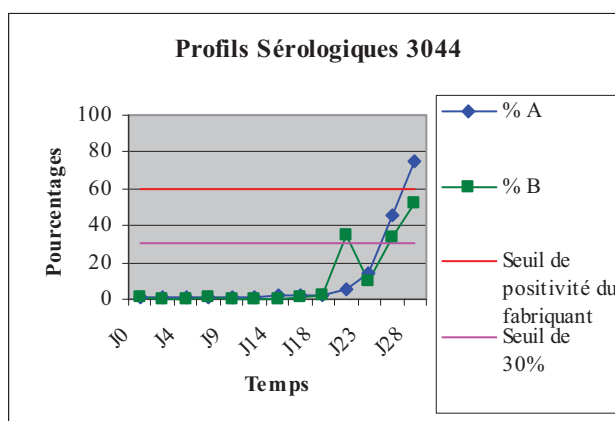


Figure 6 : Profils sérologiques de la brebis 3044

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

— Dépassement du seuil de 30%

Concernant la brebis 3044, les deux laboratoires lui attribuent un statut négatif jusqu'à J25. Les valeurs du laboratoire A sont plus élevées (de 2,3% en moyenne) que celles du laboratoire B (sauf à J0 et J21). Le dernier prélèvement de notre expérience montre une différence significative puisque la brebis est considérée négative par le laboratoire B et positive par le A.

La moyenne des résultats du laboratoire A est plus élevée de 1,27% que celle des résultats du laboratoire B.

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,871.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 14,50.

Aux seuils de 30 et 50%, cette brebis devient séropositive respectivement à partir de J25 et J28 (laboratoire A).

- **Brebis 2006**

Tableau 19 : Comparaison des sérologies de la brebis 2006 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	2,3	3,4	-	-
J2	2,5	1,4	-	-
J4	2,6	0,9	-	-
J7	3	1,3	-	-
J9	2,9	1,8	-	-
J11	4,4	2	-	-
J14	13,4	4,6	-	-
J16	17	8,2	-	-
J18	21,3	10,6	-	-
J21	23,3	10,6	-	-
J23	21,9	9,5	-	-
J25	24,2	12,1	-	-
J28	28,5	21,6	-	-
Moy	12,87	6,77		
Min	2,3	0,9		
Max	28,5	21,6		

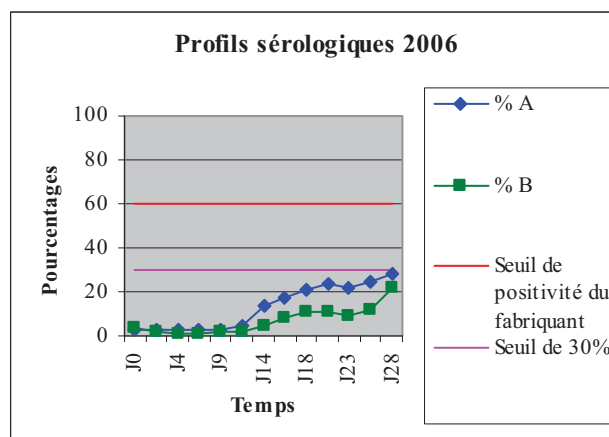


Figure 7 : Profils sérologiques de la brebis 2006

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum
 + : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires
 — Dépassement du seuil de 30%

Quel que soit le laboratoire dont les résultats proviennent, la brebis 2006 est toujours considérée négative et ces pourcentages demeurent bas puisqu'ils ne dépassent pas 28,5% pour le laboratoire A et 21,6% pour le B.

Exception faite de J0, les pourcentages donnés par le laboratoire A sont toujours supérieurs à ceux obtenus par le B (6,68%).

La moyenne des résultats du laboratoire A est plus élevée de 6,1% que celle des résultats du laboratoire B.

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,927.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 7,42.

- **Brebis 1059**

Tableau 20 : Comparaison des sérologies de la brebis 1059 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	1	0,6	-	-
J2	1	1,1	-	-
J4	1,1	0,6	-	-
J7	1,6	0	-	-
J9	1,4	0,7	-	-
J11	1,2	0,9	-	-
J14	1,7	0,9	-	-
J16	2	0,3	-	-
J18	1,9	0,9	-	-
J21	2,8	3,9	-	-
J23	9,2	5,8	-	-
J25	23,5	12,7	-	-
J28	30,7	18,5	-	-
Moy	6,09	3,61		
Min	1	0		
Max	30,7	18,5		

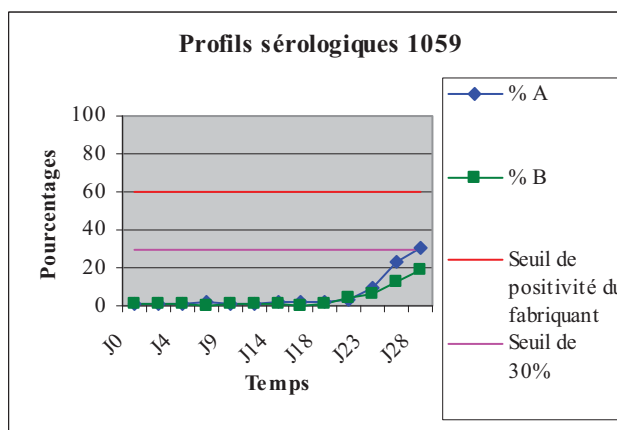


Figure 8 : Profils sérologiques de la brebis 1059

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;

B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;

Moy : moyenne ; Min : minimum ;

Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

— Dépassement du seuil de 30%

Quelque soit le laboratoire dont proviennent les résultats, la brebis 1059 est toujours séronégative avec le seuil proposé par le fabricant et ses pourcentages demeurent relativement bas avec un maximum de 18,5% pour le laboratoire B et de 30,7% pour le A. Elle ne devient positive qu'au dernier jour de l'expérience pour le laboratoire A avec le seuil de 30%.

Comme pour les brebis précédentes, la moyenne des résultats du laboratoire A (6,09%) est plus élevée (de 2,48%) que celle des résultats du laboratoire B (3,61%).

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,989.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 5,49.

- **Brebis 2015**

Tableau 21 : Comparaison des sérologies de la brebis 2015 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	1,3	0	-	-
J2	0,8	0	-	-
J4	0,9	0	-	-
J7	0	0	-	-
J9	0,1	0	-	-
J11	0,1	0	-	-
J14	0,4	0,08	-	-
J16	0,3	0	-	-
J18	0	0	-	-
J21	0,6	1,6	-	-
J23	0,9	1,9	-	-
J25	0,7	2,4	-	-
J28	0,6	0,3	-	-
Moy	0,52	0,48		
Min	0	0		
Max	1,3	2,4		

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

_____ Dépassement du seuil de 30%

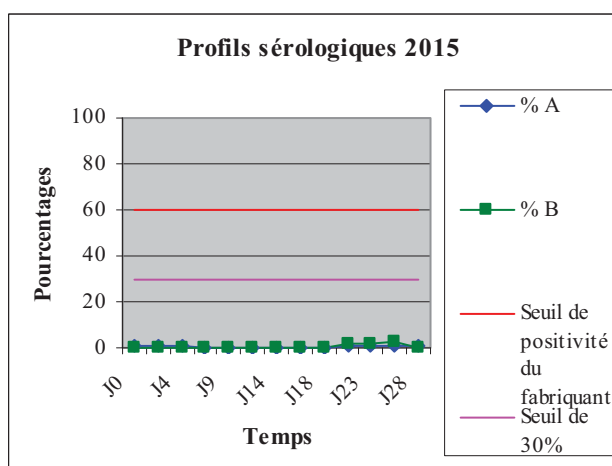


Figure 9 : Profils sérologiques de la brebis 2015

Quelque soit le laboratoire dont proviennent les résultats, la brebis 2015 est toujours séronégative et ses pourcentages demeurent extrêmement bas avec un maximum de 2,4% pour le laboratoire B et de 1,3% pour le A. Ses pourcentages dans les deux laboratoires ne s'écartent que très peu du zéro : en effet, leur moyenne est de 0,52% pour le laboratoire A et 0,48% pour le B. Sur le terrain, face à de tels résultats, aucun doute n'est permis sur le statut séronégatif de cette brebis.

Dans les 2 cas, cette brebis a les plus basses moyennes de toutes les brebis ainsi que les plus petits minimums et maximums.

Cette fois encore, on remarque que la moyenne des résultats du laboratoire A est supérieure à celle des résultats du laboratoire B.

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,314.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 0,52.

- **Brebis 3012**

Tableau 22 : Comparaison des sérologies de la brebis 3012 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	1,1	0,4	-	-
J2	1,2	0,2	-	-
J4	1,4	0,3	-	-
J7	0,9	0,8	-	-
J9	8,3	0,7	-	-
J11	13	1,1	-	-
J14	21,9	8,2	-	-
J16	31,6	12,6	-	-
J18	43,7	18,5	-	-
J21	39,5	16,1	-	-
J23	32,1	13	-	-
J25	28	13,5	-	-
J28	25,9	19,3	-	-
Moy	19,12	8,05		
Min	0,9	0,2		
Max	43,7	19,3		

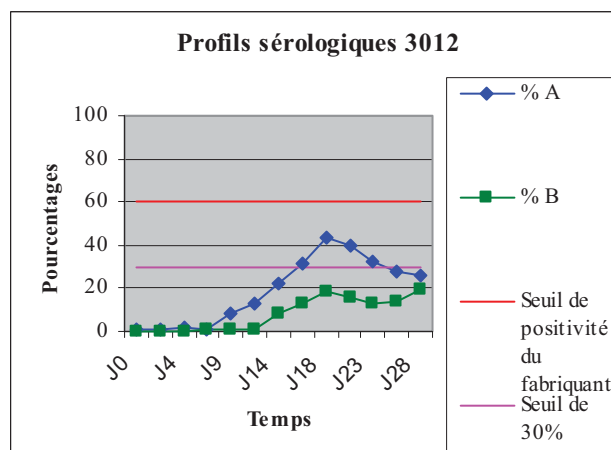


Figure 10 : Profils sérologiques de la brebis 3012

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

_____ Dépassement du seuil de 30%

Quelque soit le laboratoire dont les résultats proviennent, la brebis 3012 est toujours considérée séronégative avec le seuil donné par le fabricant. Les pourcentages sont très différents (43,7% pour le laboratoire A et 19,3% pour le B).

Les pourcentages donnés par le laboratoire A sont toujours supérieurs à ceux obtenus par le B. La différence entre les résultats des 2 laboratoires est minime au début lorsque les pourcentages sont bas et les courbes de profils sérologiques sont alors quasiment superposées. La différence augmente au fur et à mesure que les résultats deviennent plus élevés et les courbes de profils sérologiques s'écartent et sont alors bien distinctes.

La moyenne des résultats du laboratoire A (19,12%) est plus élevée de 11,07% que celle des résultats du laboratoire B (8,05%).

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,928.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 10,82.

Au seuil de 30%, cette brebis est séropositive de J16 à J23 pour le laboratoire A mais reste séronégative pour le B.

- **Brebis 3065**

Tableau 23 : Comparaison des sérologies de la brebis 3065 par le laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	20,9	11,7	-	-
J2	17,6	7,5	-	-
J4	23,8	20,9	-	-
J7	31,3	18,3	-	-
J9	27,1	30,5	-	-
J11	31,1	14,9	-	-
J14	25,2	11,7	-	-
J16	28,4	11,8	-	-
J18	30	13,1	-	-
J21	36,5	16,7	-	-
J23	39,2	24,5	-	-
J25	32,9	34,1	-	-
J28	39,7	39,9	-	-
Moy	29,52	19,66		
Min	17,6	7,5		
Max	39,7	39,9		

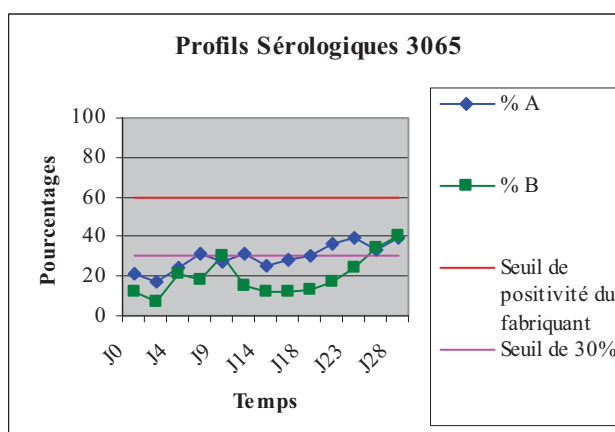


Figure 11 : Profils sérologiques de la brebis 3065

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;

B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;

Moy : moyenne ; Min : minimum ;

Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

— Dépassement du seuil de 30%

Quelque soit le laboratoire dont les résultats proviennent, la brebis 3065 est toujours séronégative avec le seuil donné par le fabricant.

Exception faite de J9, J25 et J28, les pourcentages donnés par le laboratoire A sont supérieurs à ceux obtenus par le B. Contrairement aux brebis précédentes, l'écart entre les pourcentages des laboratoires A et B n'augmentent pas lorsque les valeurs des pourcentages augmentent : les courbes se confondent en effet à la fin de l'expérience lorsque les valeurs sont maximales. On constate d'ailleurs que les valeurs minimales sont très différentes tandis que les valeurs maximales sont très proches.

La moyenne des résultats du laboratoire A (29,52%) est plus élevée de 9,86% que celle des résultats du laboratoire B (19,66%).

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,618.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 8,17.

Au seuil de 30%, cette brebis est séropositive de J18 à J28 pour le laboratoire A et de J25 à J28 pour le B.

- **Brebis 1067**

Tableau 24 : Comparaison des sérologies de la brebis 1067 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	4,1	0,1	-	-
J2	1,1	0,4	-	-
J4	0,9	0,8	-	-
J7	0,3	1	-	-
J9	2,9	2,8	-	-
J11	3,6	1	-	-
J14	15,3	8,1	-	-
J16	21	8,1	-	-
J18	26,4	18,1	-	-
J21	36,4	23,6	-	-
J23	38,6	42,3	-	-
J25	36,9	38,1	-	-
J28	43,1	34,5	-	-
Moy	17,74	13,76		
Min	0,3	0,1		
Max	43,1	42,3		

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum
 + : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires
 — Dépassement du seuil de 30%

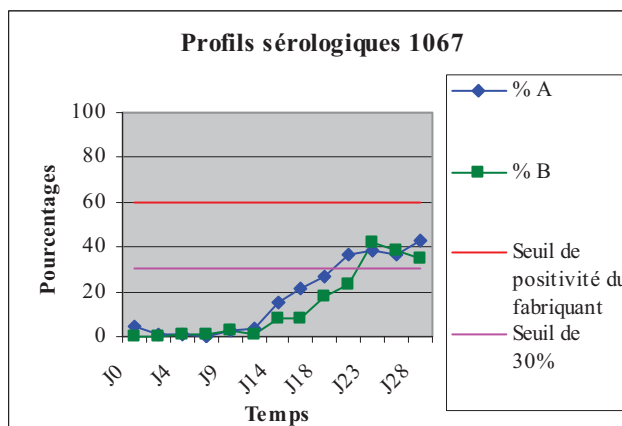


Figure 12 : Profils sérologiques de la brebis 1067

Quelque soit le laboratoire dont les résultats proviennent, la brebis 1067 est toujours séronégative au seuil donné par le fabricant.

Exception faite de J7, J23 et J25, les pourcentages donnés par le laboratoire A sont supérieurs à ceux obtenus par le laboratoire B. Les courbes de profils sérologiques sont tout de même assez proches et même confondues jusqu'en décembre. Les pourcentages minimums (0,3% pour le laboratoire A et 0,1% pour le B) sont très proches et les pourcentages maximums également (43,1% pour le A et 42,3% pour le B) même si ils ne sont pas obtenus aux mêmes dates.

La moyenne des résultats du laboratoire A (17,74%) est plus élevée de 3,98% que celle des résultats du laboratoire B (13,76%).

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,9451.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 14,29.

Au seuil de 30%, cette brebis est séropositive de J21 à la fin de l'expérience et de J25 à la fin de l'expérience pour le B.

- **Brebis 2023**

Tableau 25 : Comparaison des sérologies de la brebis 2023 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	1,8	0,6	-	-
J2	1,6	0,5	-	-
J4	2,3	1,4	-	-
J7	2,1	1,2	-	-
J9	10,9	6,3	-	-
J11	25,3	5,9	-	-
J14	24,3	10,1	-	-
J16	24,5	6,9	-	-
J18	20,9	8,3	-	-
J21	17,9	7,6	-	-
J23	21,9	15,3	-	-
J25	22,5	6,5	-	-
J28	18,3	11,8	-	-
Moy	14,95	6,34		
Min	1,6	0,5		
Max	25,3	15,3		

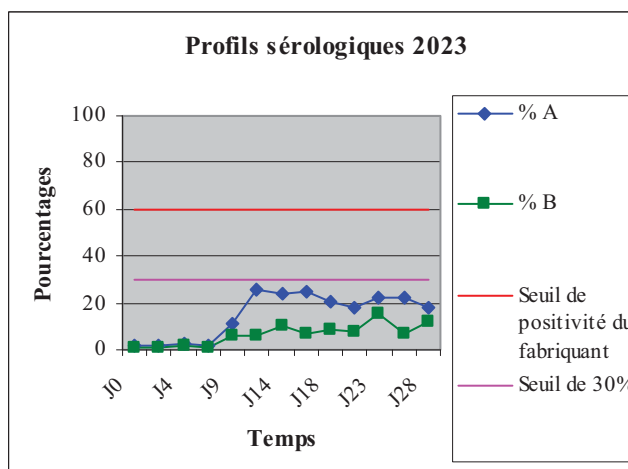


Figure 13 : Profils sérologiques de la brebis 2023

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum

+ : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires

— Dépassement du seuil de 30%

Quelque soit le laboratoire dont les résultats proviennent, la brebis 2023 est toujours séronégative et ce aux deux seuils (30 et 50%).

Les pourcentages donnés par le laboratoire A sont toujours supérieurs à ceux obtenus par le B. Les courbes de profils sérologiques sont tout de même assez proches jusqu'au 26 novembre mais diffèrent par la suite lorsque les valeurs des pourcentages augmentent avec des allures de courbes dissemblables. Les pourcentages minimums (1,6% pour le A et 0,5% pour le B), obtenus à la même date sont proches mais les pourcentages maximums le sont moins (25,3% pour le A et 15,3% pour le B) et sont obtenus à des dates différentes.

La moyenne des résultats du laboratoire A (14,95%) est plus élevée de 8,61% que celle des résultats du laboratoire B (6,34%).

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,781.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 7,43.

- **Brebis 3004**

Tableau 26 : Comparaison des sérologies de la brebis 3004 par les laboratoires A et B

Dates	A %	B %	A statuts	B statuts
J0	6,5	2,5	-	-
J2	5,8	3,2	-	-
J4	5,3	2,8	-	-
J7	6,1	3,8	-	-
J9	6,7	4,4	-	-
J11	6,4	2,9	-	-
J14	10,7	4,5	-	-
J16	30,2	18,2	-	-
J18	61,7	66	+	+
J21	64,4	69	+	+
J23	73,4	75	+	+
J25	76,7	88	+	+
J28	93,9	81	+	+
Moy	34,45	32,41		
Min	5,3	2,5		
Max	93,9	88		

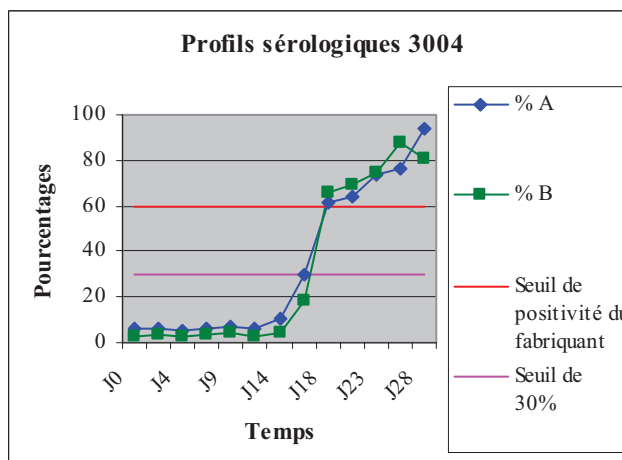


Figure 14 : Profils sérologiques de la brebis 3004

A% : pourcentages donnés par le laboratoire A ;
 B% : pourcentages donnés par le laboratoire B ;
 Moy : moyenne ; Min : minimum ;
 Max : maximum
 + : positif ; - : négatif ; +/- : douteux

Différences de statut entre les 2 laboratoires
 — Dépassement du seuil de 30%

Quelque soit le laboratoire dont les résultats proviennent, la brebis 3004 est séronégative jusqu'à J16 (inclus) avec des valeurs nettement inférieures au seuil de positivité du fabricant (30,2% pour le laboratoire A et 18,2% pour le B) puis séropositive à partir de J18 avec des valeurs qui augmentent très fortement passant à 61,7% pour le laboratoire A et 66% pour le B. Les pourcentages donnés par le laboratoire A sont toujours supérieurs à ceux obtenus par le B pour la première période durant laquelle la brebis 3004 est négative. Pendant la seconde période, lorsque la brebis est positive, c'est l'inverse (sauf à J28).

Les courbes de profils sérologiques ont des allures très semblables avec des valeurs basses et relativement stables jusqu'à J14 puis une nette augmentation jusqu'à J18 et enfin une augmentation plus douce jusqu'à J28. Les pourcentages maximums sont très élevés (93,9% le 15 décembre pour le laboratoire A et 88% le 12 décembre pour le B) et sont tous deux les pourcentages maximum de toutes les brebis.

Les moyennes du laboratoire A (34,45%) et du laboratoire B (32,41%) sont très proches et très élevées, la moyenne donnée par le A restant supérieure à celle du B.

Le coefficient de corrélation de ces deux séries de données est de : 0,985.

L'écart moyen entre ces deux séries de données est de 31,91.

Au seuil de 30%, cette brebis est séropositive de J16 à J28, fin de l'expérimentation, pour le laboratoire A.

3.2.1.2- Etude de la variabilité inter-laboratoire : synthèse

La comparaison date par date des titres sérologiques obtenus dans les deux laboratoires, pour l'ensemble des brebis des deux lots, ne montre pas de différence significative (test t de Student, p compris entre 0,12 et 0,68).

Pour 8 des 10 brebis, le laboratoire d'analyse des échantillons ne change rien à leur statut sérologique aux seuils du fabricant. En effets, même si les pourcentages donnés par les deux laboratoires sont parfois différents, les brebis 2006, 1059, 2015, 3012, 3065, 1067 et 2023 sont toujours séronégatives. De même, d'après les deux laboratoires, la brebis 3004 est séronégative jusqu'au 3 décembre (J14) et séropositive à partir du 5 décembre (J16).

Cependant les deux laboratoires attribuent des statuts sérologiques différents à 2 brebis du lot 1 : la 1037 et la 3044. La brebis 1037 est d'abord considérée séronégative par les 2 laboratoires jusqu'à J11, et à J25 et J28 elle est considérée séropositive par les 2 laboratoires. Au contraire, entre J14 et J23, les statuts sérologiques attribués à cette brebis par le laboratoire A d'une part et par le B d'autre part sont très différents : le laboratoire A la décrit comme douteuse ou positive tandis que le laboratoire B la considère négative. La brebis 3044 est toujours déclarée séronégative par le laboratoire B alors qu'elle est séropositive en fin d'expérience pour le laboratoire A.

La moyenne des pourcentages de toutes les brebis obtenue par le laboratoire A est toujours supérieure à celle donnée par le laboratoire B. De même sur 130 prélèvements (13 dates par brebis avec 10 brebis) envoyés aux deux laboratoires, 110 obtiennent des valeurs supérieures au laboratoire A par rapport à celles obtenue au laboratoire B (soit 84,62% des prélèvements). De plus, on remarque que, de manière générale, plus les pourcentages sont élevés, plus l'écart entre les valeurs données par le laboratoire A et celles données par le laboratoire B augmente.

Tableau 27 : moyennes des titres sérologiques des brebis du lot 1 (10³ UFC) par les laboratoires A et B

Dates	Moyennes A	Moyennes B
J0	1,34	1,12
J2	1,26	0,6
J4	1,66	0,38
J7	1,38	0,44
J9	1,62	0,7
J11	4,36	2,88
J14	14,52	8,436
J16	14,7	10,28
J18	18,48	11,46
J21	17,82	16,78
J23	22,08	13,72
J25	32,24	25,08
J28	42,9	31,64

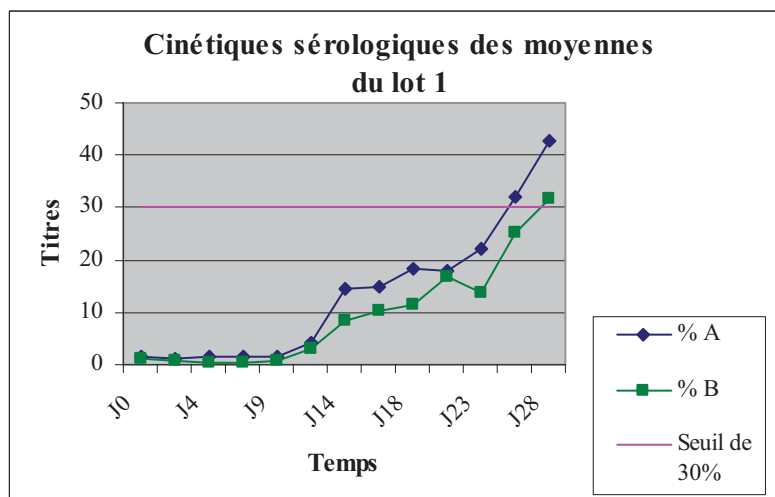


Figure 15 : cinétiques des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 1 (10³ UFC)

Le coefficient de corrélation entre les deux laboratoires pour le lot 1 est de 0,988 et l'écart moyen de 9,53.

Les moyennes des titres des brebis du lot 1 donnés par le laboratoire A aux différentes dates sont toujours supérieures à celles données par le laboratoire B. Ces deux séries de valeurs sont plus proches en début d'expérience lorsque les titres sont bas qu'en fin d'expérience lorsque les titres augmentent.

Cependant, les courbes de cinétique moyennes du lot 1 obtenues avec les résultats des 2 laboratoires sont assez semblables et ont la même allure. En début d'expérience, jusqu'au 28 novembre, les courbes des 2 laboratoires sont pratiquement superposées. Elles se séparent ensuite mais restent parallèles et augmentent simultanément.

Tableau 28 : moyennes des titres sérologiques des brebis du lot 2 (10⁵ UFC) par les laboratoires A et B

Dates	Moyennes A	Moyennes B
J0	6,88	3,06
J2	5,46	2,36
J4	6,74	5,24
J7	8,14	5,02
J9	11,18	8,94
J11	15,88	5,16
J14	19,48	8,52
J16	27,14	11,52
J18	36,54	24,8
J21	38,94	26,6
J23	41,04	34,02
J25	39,4	36,04
J28	44,18	37,3

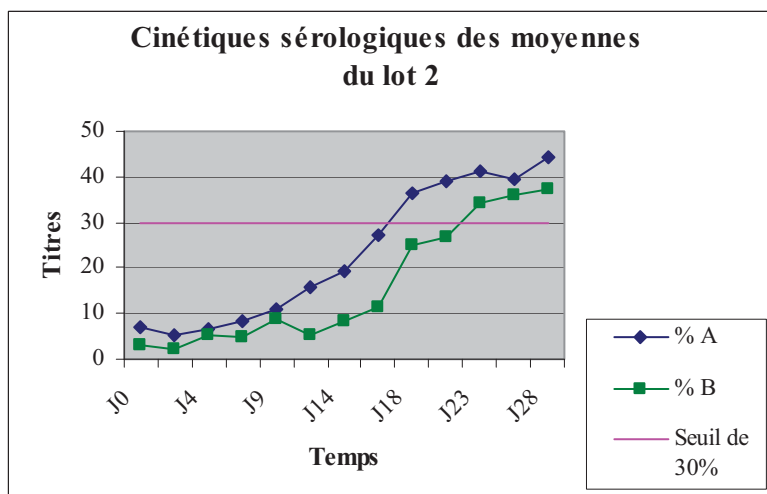


Figure 16 : cinétiques des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 2 (10⁵ UFC)

Le coefficient de corrélation entre les deux laboratoires pour le lot 2 est de 0,953 et l'écart moyen de 13,11.

Les moyennes des titres des brebis du lot 2 données par le laboratoire A aux différentes dates sont toujours supérieures à celles données par le laboratoire B. Les deux séries de valeurs sont assez proches au début jusqu'à J9. L'écart entre les deux séries de valeurs augmente ensuite et devient important (entre J11 et le J23) puis diminue de nouveau en fin d'expérience.

Contrairement à celles du lot 1, les courbes de cinétique moyennes du lot 2 des deux laboratoires n'ont pas tout à fait la même allure et ne sont ni confondues ni parallèles (même si leurs courbes de tendance linéaire croissent toutes les deux). Les courbes du lot 2 sont moins semblables que celles du lot 1.

Tableau 29 : moyennes des titres sérologiques de toutes les brebis par les laboratoires A et B

Dates	Moyennes A	Moyennes B
17/11	4,11	2,09
19/11	3,36	1,48
21/11	4,2	2,81
24/11	4,76	2,73
26/11	6,4	4,82
28/11	10,12	4,02
01/12	17	8,478
03/12	20,92	10,9
05/12	27,51	18,13
08/12	28,38	21,69
10/12	31,56	23,87
12/12	35,82	30,56
15/12	43,54	34,47

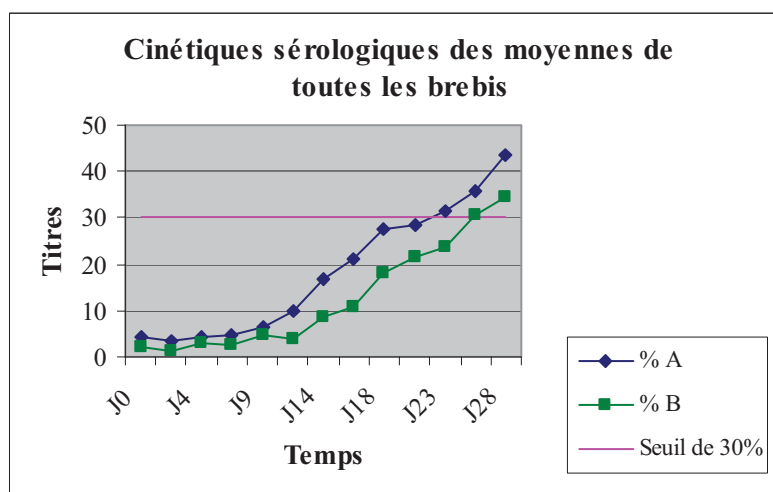


Figure 17 : cinétiques des moyennes arithmétiques des titres sérologiques de toutes les brebis

Le coefficient de corrélation entre les deux laboratoires pour les 2 lots est de 0,982 et l'écart moyen de 11,32.

Les moyennes des titres de toutes les brebis des lots 1 et 2 données par le laboratoire A aux différentes dates sont toujours supérieures à celles données par le laboratoire B.

Les deux courbes ont des allures semblables : elles sont presque superposées jusqu'à J9 puis s'écartent mais restent relativement proches et parallèles.

3.2.2- Etude sérologique

Dans cette partie, nous allons étudier le profil sérologique de chaque brebis et de chaque groupe de brebis à partir des résultats du laboratoire B qui sont regroupés dans le tableau suivant (tableau 30).

Tableau 30 : titres sérologiques en pourcentage des brebis (données du laboratoire B)

Brebis	J0	J2	J4	J7	J9	J11	J14	J16	J18	J21	J23	J25	J28
1037	0,3	0,1	0	0,2	0,6	11,1	36,2	42,1	44,1	33,5	41,6	64	66
3044	1,3	0,4	0,4	0,7	0,4	0,4	0,4	0,8	1,7	34,3	9,8	34,2	51,8
2006	3,4	1,4	0,9	1,3	1,8	2	4,6	8,2	10,6	10,6	9,5	12,1	21,6
1059	0,6	1,1	0,6	0,4	0,7	0,9	0,9	0,3	0,9	3,9	5,8	12,7	18,5
2015	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0	1,6	1,9	2,4	0,3
3012	0,4	0,2	0,3	0,8	0,7	1,1	8,2	12,6	18,5	16,1	13	13,5	19,3
3065	11,7	7,5	20,9	18,3	30,5	14,9	11,7	11,8	13,1	16,7	24,5	34,1	39,9
1067	0,1	0,4	0,8	1	2,8	1	8,1	8,1	18,1	23,6	42,3	38,1	34,5
2023	0,6	0,5	1,4	1,2	6,3	5,9	10,1	6,9	8,3	7,6	15,3	6,5	11,8
3004	2,5	3,2	2,8	3,8	4,4	2,9	4,5	18,2	66	69	75	88	81

Nous avons calculé pour chaque brebis : la moyenne, la médiane, l'écart type, l'écart typep et l'écart moyen ; les principales données statistiques sont présentées dans le tableau suivant (tableau 31).

Tableau 31 : données statistiques sur les titres sérologiques (données du laboratoire B)

Brebis	Lot	Moyenne (T _{moy})	Moyenne lot	Médiane	Ecart type	Ecart typep	Ecart moyen	Minimum	Maximum (T _{max})
1037	Lot 1	26,14	9,51	33,5	25,12	24,14	22,24	0	66
3044		10,51		0,8	17,55	16,86	13,66	0,4	51,8
2006		6,77		4,6	6,08	5,84	4,92	0,9	21,6
1059		3,64		0,9	5,67	5,44	4,05	0,3	18,5
2015		0,48		0	0,87	0,83	0,68	0	2,4
3012	lot 2	8,05	16,04	8,2	7,12	7,39	6,90	0,2	19,3
3065		19,66		16,7	9,89	9,50	7,94	7,5	39,9
1067		13,76		8,1	15,80	15,18	13,51	0,1	42,3
2023		6,34		6,5	4,55	4,37	3,40	0,5	15,3
3004		32,41		4,5	36,30	34,88	33,38	2,5	88

Tous les nombres sont arrondis au 2^{ème} chiffre après la virgule.

La moyenne totale de toutes les brebis des groupes 1 et 2 est de 12,776.

Dans cette partie, chaque brebis est décrite grâce à sa cinétique sérologique obtenue en retraçant les titres (en pourcentages) en fonction du temps. La courbe est toujours présentée par rapport au seuil de positivité de 60%.

Chaque brebis est également caractérisée par plusieurs valeurs :

- La moyenne de ses titres sérologiques notée T_{moy}.
- La première valeur de séroconversion : premier prélèvement dans le temps dont le titre est supérieur à la moyenne de tous les titres de la brebis. Il sera noté T_s.
- La date de séroconversion : date du 1^{er} prélèvement dont le titre est supérieur à la moyenne de tous les titres de la brebis considérée.
- La durée de la phase initiale : durée entre le début de l'expérience (le titre du 1^{er} prélèvement sanguin) et la date du prélèvement précédant T_s (inclusive). Elle sera notée D_i.
- La valeur du titre maximum : titre ayant la valeur la plus élevée de tous les titres de la brebis considérée. Il sera noté T_{max}.
- La durée de séroconversion : durée entre la date du prélèvement précédant T_s (non inclusive) et la date du prélèvement ayant le titre maximal (inclusive). Elle sera notée D_s.
- La durée du plateau ou durée de décroissance : durée entre la date du prélèvement ayant le titre maximum (non inclusive) et le dernier prélèvement (15 décembre 2008). Elle sera notée D_p.

Ces caractéristiques sont regroupées dans un tableau par brebis qui suit la courbe de cette brebis.

Nous étudierons également les écarts entre le titre maximum et le titre minimum de chaque brebis d'une part et celui entre le titre maximum et le titre moyen de chaque brebis d'autre part.

De plus, nous allons croiser ces données avec les résultats sérologiques du laboratoire A et avec les résultats des bactériologies générales et surtout mycoplasmiques effectuées sur le lait des brebis. Le tableau ci-dessous (tableau 32) permet de visualiser les statuts sérologiques et bactériologiques de tous les animaux des lots 1 et 2.

Tableau 32 : comparaison des statuts sérologiques et bactériologiques des brebis

		17/11	19/11	21/11	24/11	26/11	28/11	01/12	03/12	05/12	08/12	10/12	12/12	15/12
LOT 1	1037							+/-*>	+/-*>	+/-*>	+/-*>	*>	+*>	+*>
	3044											>	>	+/-*>
	2006													
	1059													>
	2015													
LOT 2	3012								>	>	>	>		
	3065									>	>	>	>	+/->
	1067											>	>	+/->
	2023													
	3004								>	+*>	+*>	+*>	+*>	+*>


+ : Séropositive au seuil du fabricant (laboratoire B)


+/- : Pourcentage sérologique entre 35 et 60% (laboratoire B) : douteux

* : Séropositive ou douteuse (laboratoire A)

> : Séropositive au seuil de 30%

 Bactériologie mycoplasmique positive sur le lait d'une seule héli-mamelle à la 1^{ère} dilution

 Bactériologie mycoplasmique positive sur le lait d'une seule héli-mamelle à la 2^{ème} dilution

 Bactériologie mycoplasmique positive sur le lait des 2 héli-mamelles

Cette partie de l'étude a pour but de décrire les résultats sérologiques de chaque brebis et chaque lot de brebis et de tenter de déterminer si l'antigène inoculé a été reconnu, et s'il y a un effet du titre de l'inoculum sur le profil sérologique et l'excrétion mammaire des femelles infectées. De plus, nous verrons s'il existe une corrélation entre les titres sérologiques des brebis (leurs statuts séropositifs ou séronégatifs) et les résultats de leurs bactériologies.

3.2.2.1- Etude de la brebis 1037

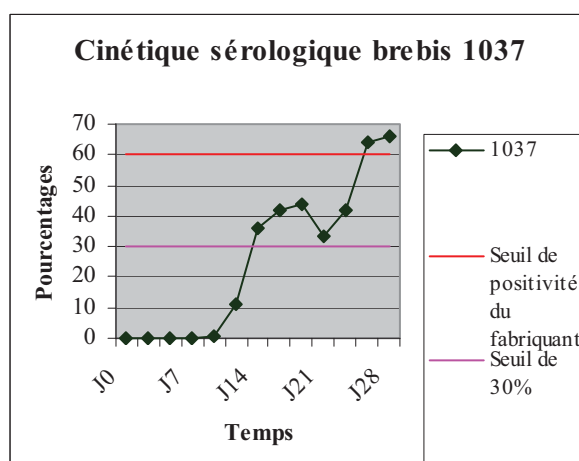


Figure 18 : Cinétique des titres sérologique de la brebis 1037 (données du laboratoire B)

Tableau 33 : Valeurs caractérisant la brebis 1037

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
26,4	36,2 (01/12)	[17/11 ; 28/11] 12 jours	66 (15/12)]28/11 ; 15/12] 17 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique n'est pas plate et croît de manière très importante.

La durée de la phase initiale est de 12 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 2,05 et l'écart-type de 4,34. La phase de séroconversion est plus longue puisqu'elle dure 17 jours avec une moyenne des titres de cette période égale à 46,79 et un écart type de 12,98. Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis. En observant l'allure de la courbe, il semble pourtant que les titres (ou pourcentages) se stabilisent vers la fin et que la courbe tend vers un plateau entre le 12 (J25) et le 15 décembre (J28). La durée de l'expérience (29 jours) est probablement trop courte pour pouvoir observer une décroissance des titres sérologiques.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 66 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 39,6. Ces deux écarts sont très importants.

L'ensemble de ces caractéristiques tendent à montrer qu'il y a réellement eu séroconversion et séropositivation.

3.2.2.2- Etude de la brebis 3044

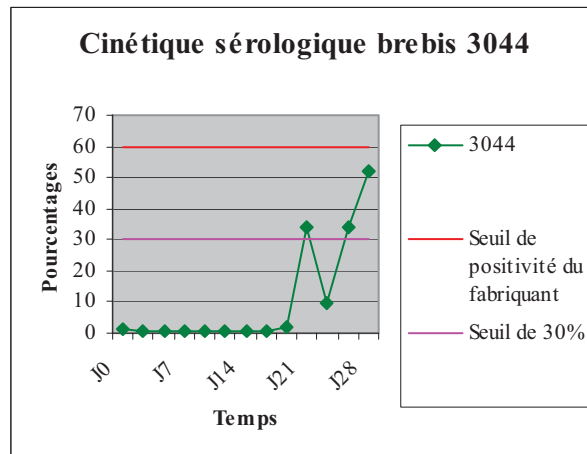


Figure 19 : Cinétique des titres sérologique de la brebis 3044 (données du laboratoire B)

Tableau 34 : Valeurs caractérisant la brebis 3044

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
10,51	34,3 (08/12)	[17/11 ; 05/12] 19 jours	51,8 (15/12)]05/12 ; 15/12] 10 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique n'est pas plate et croit de manière importante à partir du 5 décembre (J18).

La durée de la phase initiale est de 19 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 0,72 et l'écart-type de 0,48. La phase de séroconversion est moins longue et ne dure que 10 jours avec une moyenne des titres de cette période égale à 32,53 et un écart type de 17,26. Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis car le titre maximum n'est atteint qu'au dernier jour de prélèvement. En observant l'allure de la courbe, celle-ci ne semble pas être sur le point de se stabiliser en un palier, mais semble au contraire être en train de croître fortement. La durée de l'expérience (29 jours) ne permet pas de savoir avec certitude si cet animal aurait pu se positiver ou non.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 51,4 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 41,29. Ces deux écarts sont importants.

L'ensemble de ces caractéristiques tendent à montrer qu'il y a réellement eu séroconversion (et séropositivation au seuil de 30%).

3.2.2.3- Etude de la brebis 2006

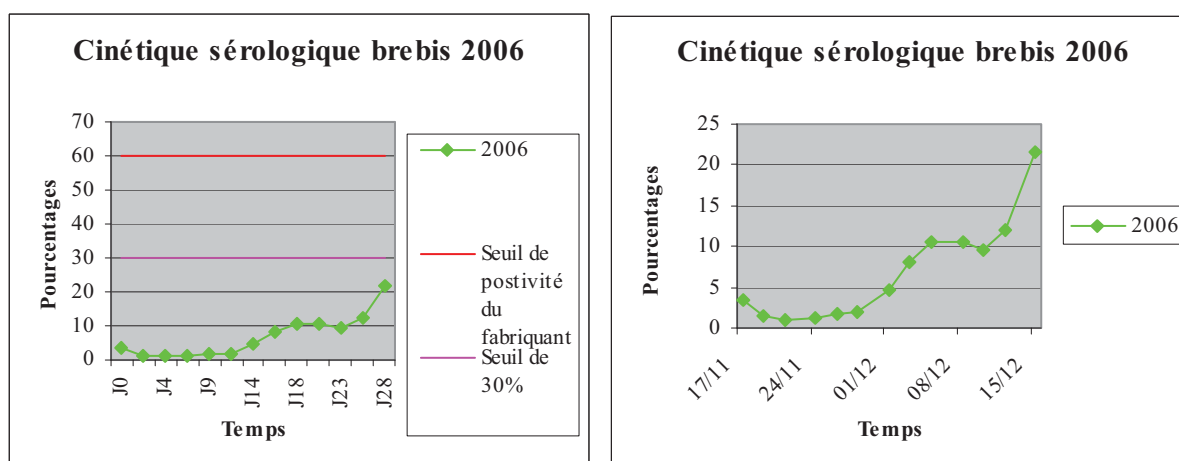


Figure 20 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 2006 (données du laboratoire B)

Tableau 35 : Valeurs caractérisant la brebis 2006

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
6,77	8,2 (03/12)	[17/11 ; 01/12] 15 jours	21,6 (15/12)]01/12 ; 15/12] 14 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique n'est pas plate.

La durée de la phase initiale est de 15 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 2,2 et l'écart-type de 1,33. La phase de séroconversion a à peu près la même durée (14 jours) avec une moyenne des titres de cette période égale à 12,1 et un écart type de 4,83.

Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis car le titre maximum n'est atteint que le 15 décembre (J28, dernier jour de l'expérimentation). L'allure de la courbe, laisse penser que les titres pouvaient continuer à augmenter (sans pour autant atteindre le seuil des 60%).

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 20,7 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 14,83. Ces deux écarts sont bien moins importants que ceux des 2 brebis précédentes.

3.2.2.4- Etude de la brebis 1059

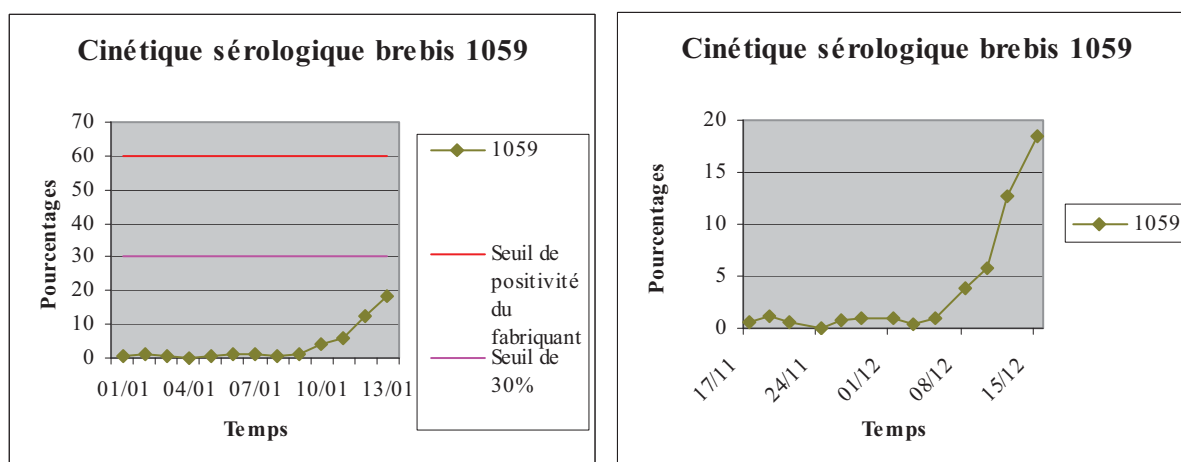


Figure 21 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 1059 (données du laboratoire B)

Tableau 36 : Valeurs caractérisant la brebis 1059

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
3,64	3,9 (08/12)	[17/11 ; 05/12] 19 jours	18,5 (15/12)]05/12 ; 15/12] 10 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique est très plate jusqu'au 5 décembre (J18) environ puis croît de plus en plus fortement dans la seconde partie de l'expérience.

La durée de la phase initiale est très longue (19 jours) : la moyenne des titres sur cette période est de 0,67 et l'écart-type de 0,34. De ce fait, la phase de séroconversion est courte puisqu'elle ne dure que 10 jours avec une moyenne des titres égale à 10,23 pendant cette période et un écart type de 6,69.

Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis, le maximum étant seulement atteint le dernier jour de prélèvement. Comme pour la brebis précédente (2006), l'allure de la courbe laisse penser que les titres pouvaient continuer à augmenter.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 18,2 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 14,86.

Les caractéristiques de la brebis 1059 sont très proches de celles de la 2006. Ces deux animaux ont des profils sérologiques semblables.

3.2.2.5- Etude de la brebis 2015

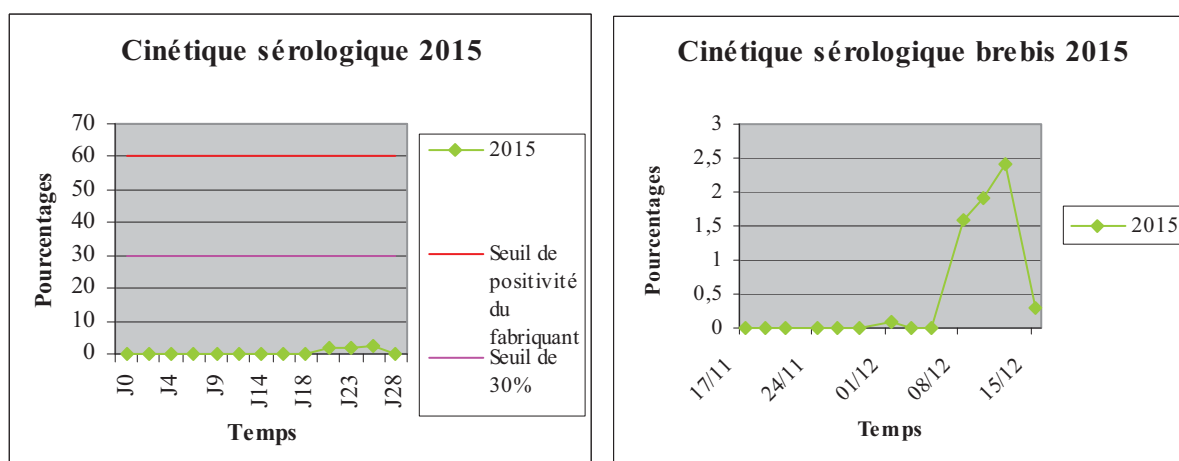


Figure 22 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 2015 (données du laboratoire B)

Tableau 37 : Valeurs caractérisant la brebis 2015

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
0,48	1,6 (08/12)	[17/11 ; 05/12] 19 jours	2,4 (12/12)]05/12 ; 12/12] 7 jours]12/12 ; 15/12] 3 jours

La courbe de cinétique des titres sérologique est extrêmement plate tout au long de l'expérience. Seul un minuscule pic (2,4%) est observé le 12 décembre (J25).

La durée de la phase initiale est très longue (19 jours) : la moyenne des titres sur cette période est de 0 (0,0089) et l'écart-type de 0,03. De ce fait, la phase d'augmentation est très courte puisqu'elle ne dure que 7 jours avec une moyenne des titres égale à 1,97 pendant cette période et un écart type de 0,40.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 2,4 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 1,2.

L'ensemble de ces caractéristiques ne permettent pas d'établir l'existence d'une séroconversion.

3.2.2.6- Etude de la brebis 3012

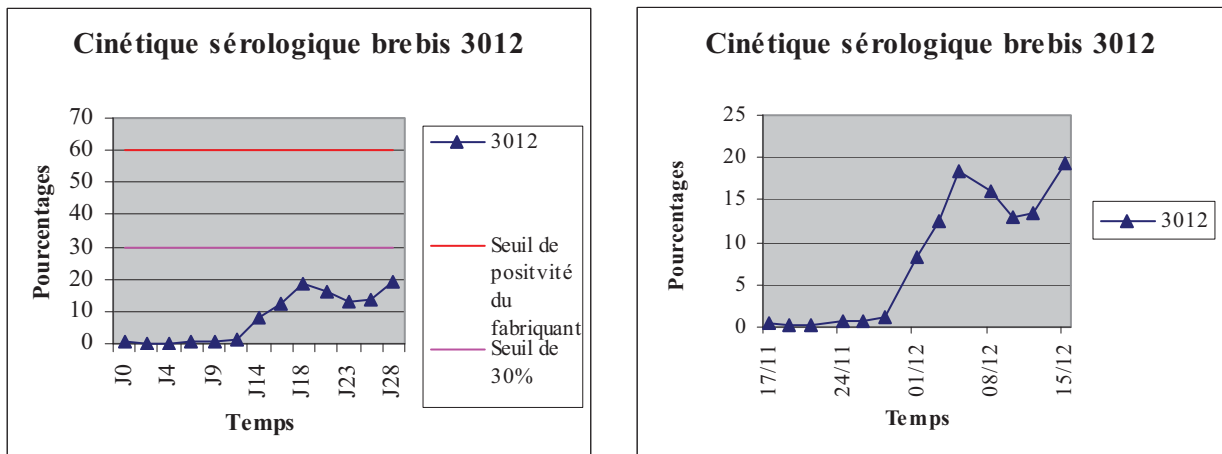


Figure 23 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 3012 (données du laboratoire B)

Tableau 38 : Valeurs caractérisant la brebis 3012

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
8,05	8,2 (01/12)	[17/11 ; 28/11] 12 jours	19,3 (15/12)]28/11 ; 15/12] 17 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique est très plate jusqu'au 28 novembre (J11) environ puis croît dans la seconde partie de l'expérience et forme un pallier.

La durée de la phase initiale est de 12 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 0,58 et l'écart-type de 0,34. La phase de séroconversion dure que 17 jours avec une moyenne des titres égale à 14,46 pendant cette période et un écart type de 3,83.

Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis, le maximum étant seulement atteint le dernier jour de prélèvement.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 19,3 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 11,25.

3.2.2.7- Etude de la brebis 3065

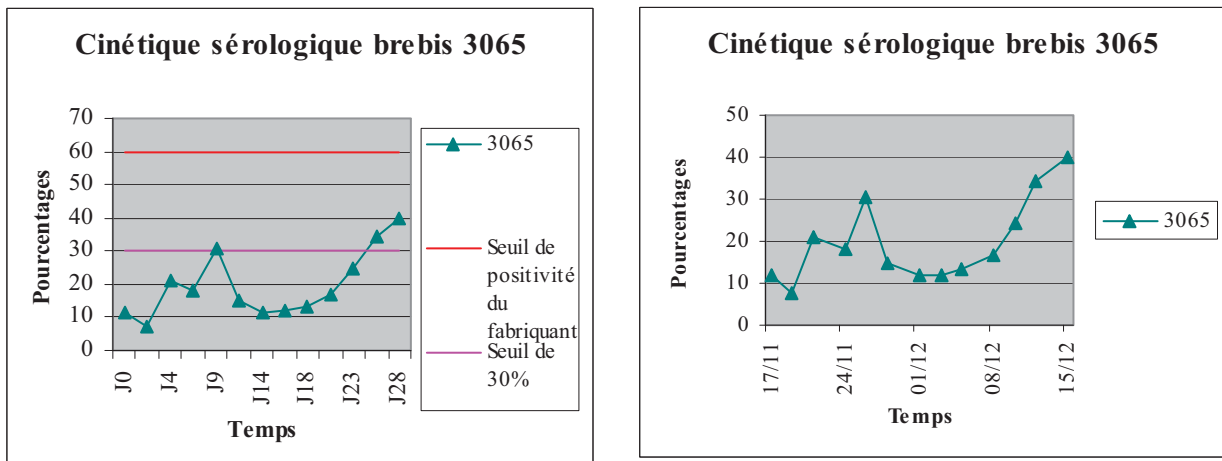


Figure 24 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 3065 (données du laboratoire B)

Tableau 39 : Valeurs caractérisant la brebis 3065

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
19,6	20,9 (21/11)	[17/11 ; 19/11] 3 jours	39,9 (15/12)]19/11 ; 15/12] 26 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologiques est très différente de celles étudiées précédemment puisqu'elle montre un double pic dès le début de l'expérience, puis une phase avec des valeurs proches et basses et enfin une deuxième phase de croissance.

Avec le modèle que nous avons choisi la durée de la phase initiale est extrêmement courte (3 jours) : la moyenne des titres sur cette période est de 9,6 et l'écart-type de 2,97. De ce fait, la phase de séroconversion est remarquablement longue puisqu'elle ne dure que 26 jours avec une moyenne des titres égale à 21,49 pendant cette période et un écart type de 9,62. Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis, le maximum étant seulement atteint le dernier jour de prélèvement. L'allure de la courbe laisse penser que les titres pouvaient continuer à augmenter (sans pour autant atteindre forcément le seuil des 60%).

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 32,4 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 20,24.

Le modèle que nous avons choisi pour décrire les profils sérologiques des brebis semble ne pas convenir à celle-ci et montre ses limites.

3.2.2.8- Etude de la brebis 1067

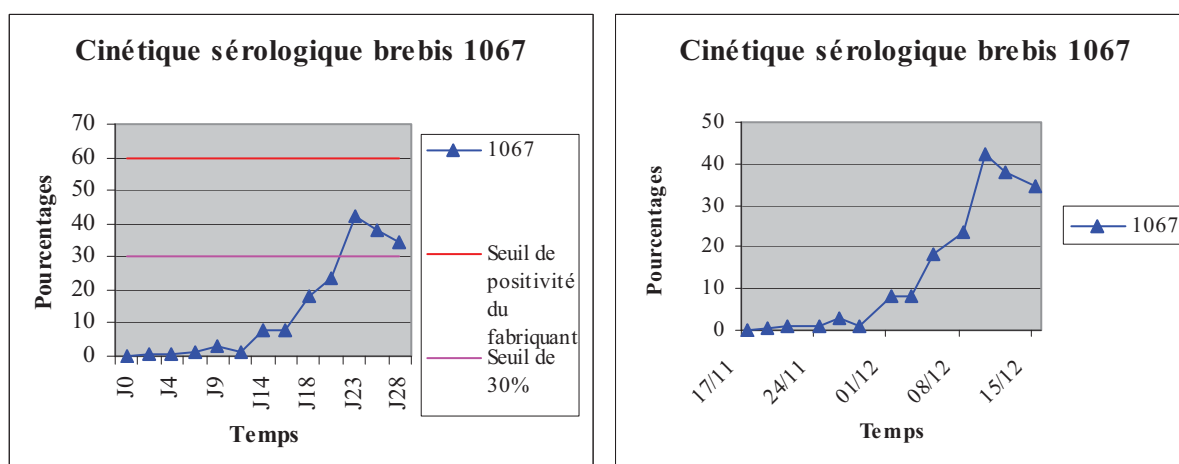


Figure 25 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 1067 (données du laboratoire B)

Tableau 40 : Valeurs caractérisant la brebis 1067

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
13,76	18,1 (05/12)	[17/11 ; 03/12] 17 jours	42,3 (10/12)]03/12 ; 10/12] 7 jours]10/12 ; 15/12] 5 jours

La courbe de cinétique des titres sérologique est très plate jusqu'au 28 novembre (J11) environ puis présente un pic très net. En effet, elle croît légèrement jusqu'au 3 décembre (J16), puis elle croît plus fortement pour atteindre son maximum le 10 décembre (J23). Enfin, elle décroît légèrement en fin d'expérience.

La durée de la phase initiale est longue (17 jours), mais comprend le début de la légère croissance décrite plus haut : la moyenne des titres sur cette période est de 2,79 et l'écart-type de 3,37. De ce fait, la phase de séroconversion qui correspond ici à la forte croissance est courte (7 jours) avec une moyenne des titres égale à 28 pendant cette période et un écart type de 12,69. La phase de décroissance dure 5 jours avec une moyenne des titres de 36,3 et un écart-type de 2,55.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 42,2 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 28,54.

Les caractéristiques de la brebis 1067 arguent en faveur d'une séroconversion, même si les valeurs restent nettement inférieures à 60%.

A partir du 10 décembre (J23) cette brebis a des titres supérieurs à 30%.

3.2.2.9- Etude de la brebis 2023

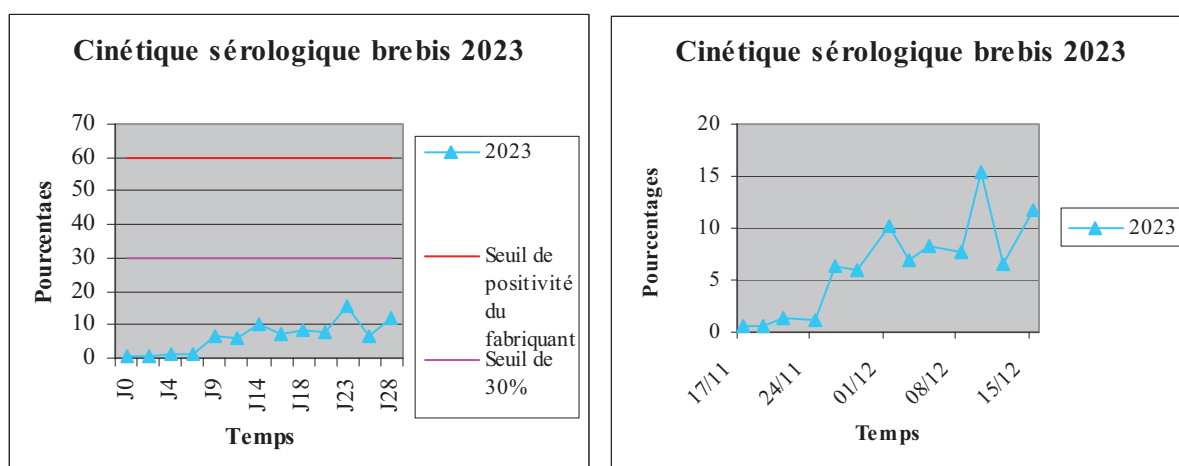


Figure 26 : cinétique des titres sérologiques de la brebis 2023 (données du laboratoire B)

Tableau 41 : Valeurs caractérisant la brebis 2023

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
6,34	10,1 (01/12)	[17/11 ; 28/11] 12 jours	15,3 (10/12)]28/11 ; 10/12] 12 jours]10/12 ; 15/12] 5 jours

La courbe de cinétique des titres sérologique est légèrement croissante à partir du 24 novembre (J7), mais ne montre pas de pic net.

La durée de la phase initiale est de 12 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 2,65 et l'écart-type de 2,70. La phase de séroconversion dure que 12 jours avec une moyenne des titres égale à 9,64 pendant cette période et un écart type de 3,38. La phase de plateau dure quant à elle 5 jours avec une moyenne des titres de 9,15 et un écart-type de 3,75 sur cette période.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 14,8 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 8,96.

3.2.2.10- Etude de la brebis 3004

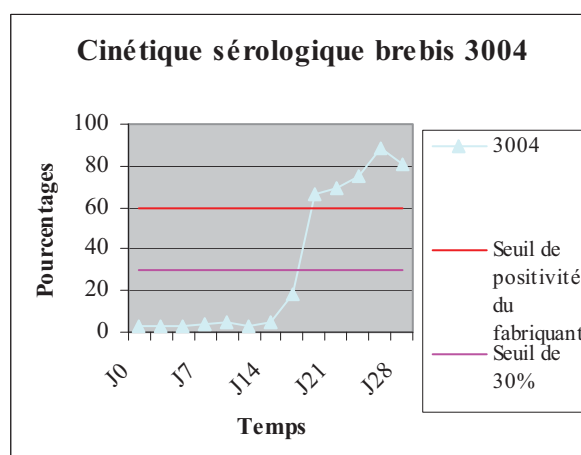


Figure 27 : Cinétique des titres sérologiques de la brebis 3004 (données du laboratoire B)

Tableau 42 : Valeurs caractérisant la brebis 3004

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
32,41	66 (05/12)	[17/11 ; 03/12] 17 jours	88 (12/12)]03/12 ; 12/12] 9 jours]12/12 ; 15/12] 3 jours

La courbe de cinétique des titres sérologique est très plate jusqu'au 1^{er} décembre (J14) puis croît très fortement et rapidement du 1^{er} au 5 décembre (J18). Enfin, elle croît doucement pour atteindre son maximum le 12 décembre (J25) et décroître le 15 décembre (J28). Cette courbe forme donc un pic avec une sorte de plateau.

La durée de la phase initiale est très longue (17 jours) : la moyenne des titres sur cette période est de 5,29 et l'écart-type de 5,27. De ce fait, la phase de séroconversion est courte puisqu'elle ne dure que 9 jours avec une moyenne des titres égale à 74,5 pendant cette période et un écart type de 9,45. Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, la durée de décroissance n'est que de 3 jours. Au cours de cette période la moyenne des titres sérologiques est de 81. Avec des critères différents nous aurions pu mettre en évidence une phase de plateau plus longue que la phase de décroissance que nous venons de décrire.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 85,5; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 55,59. Ces deux écarts sont les plus importants de toutes les brebis.

Les caractéristiques de la brebis 3004 sont proches de celles de la 1037.

3.2.2.11- Etude du lot 1

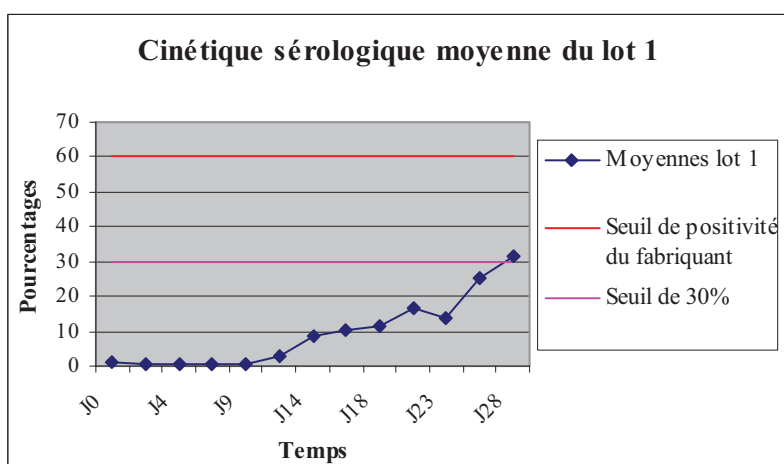


Figure 28 : Cinétique des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 1

Tableau 43 : Valeurs caractérisant le lot 1

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
9,51	10,28 (03/12)	[17/11 ; 01/12] 15 jours	31,64 (15/12)]01/12 ; 15/12] 14 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique est plate jusqu'au 26 novembre (J9) avec des moyennes de titres très proches de zéro. Puis la courbe croît, et les valeurs des moyennes des titres augmentent toujours à l'exception du 10 décembre (J23).

La durée de la phase initiale est de 15 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 2,09 et l'écart-type de 2,93. La phase de séroconversion a à peu près la même durée (14 jours) avec une moyenne des titres de cette période égale à 18,6 et un écart type de 8,46. Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour le lot 1 car le titre maximum n'est atteint que le 15 décembre (J28, dernier jour de l'expérimentation). L'allure de la courbe, laisse penser que les titres pouvaient continuer à augmenter.

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 31,26 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 22,13.

La moyenne du lot 1 n'est jamais considérée séropositive au seuil du fabricant (60%) mais l'est à J28 au seuil de 30%.

3.2.2.12- Etude du lot 2

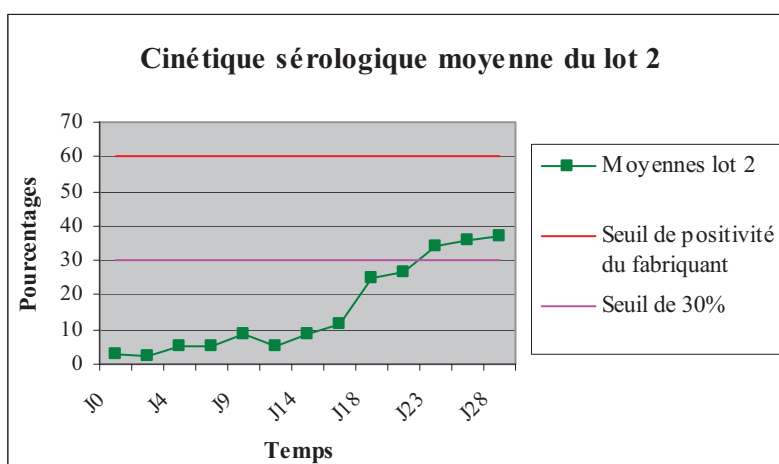


Figure 29 : Cinétique des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis du lot 2

Tableau 44 : Valeurs caractérisant le lot 2

T_{moy}	T_s (date)	D_i	T_{max} (date)	D_s	D_p
16,04	24,8 (05/12)	[17/11 ; 03/12] 17 jours	37,3 (15/12)]03/12 ; 15/12] 12 jours	

La courbe de cinétique des titres sérologique est assez plate jusqu'au 28 novembre (J11) puis devient fortement croissante entre le 1^{er} (J14) et le 8 décembre (J21). Enfin, sa croissance ralentit du 10 (J23) au 15 décembre (J28) avec une allure de plateau.

La durée de la phase initiale est de 17 jours : la moyenne des titres sur cette période est de 6,68 et l'écart-type de 3,14. La phase de séroconversion est plus courte (12 jours) avec une moyenne des titres de cette période égale à 31,75 et un écart type de 5,68.

Avec les critères du modèle que nous avons choisi pour cette partie, aucune durée de plateau (ou de décroissance) n'est disponible pour cette brebis car le titre maximum n'est atteint que le 15 décembre (J28, dernier jour d'expérimentation).

La différence entre le titre maximum et le titre minimum est de 34,94 ; celle entre le titre maximum et le titre moyen est de 21,26.

La moyenne du lot 2 n'est jamais considérée séropositive au seuil du fabricant (60%) mais l'est de J23 à la fin de l'expérience au seuil de 30%.

3.2.2.13- Etude comparative des lots

Tableau 45 : moyennes arithmétiques des titres des lots 1 et 2

Dates	Moy lot 1	Moy lot 2
17/11	1,12	3,06
19/11	0,6	2,36
21/11	0,38	5,24
24/11	0,52	5,02
26/11	0,7	8,94
28/11	2,88	5,16
01/12	8,44	8,52
03/12	10,28	11,52
05/12	11,46	24,8
08/12	16,78	26,6
10/12	13,72	34,02
12/12	25,08	36,04
15/12	31,64	37,3

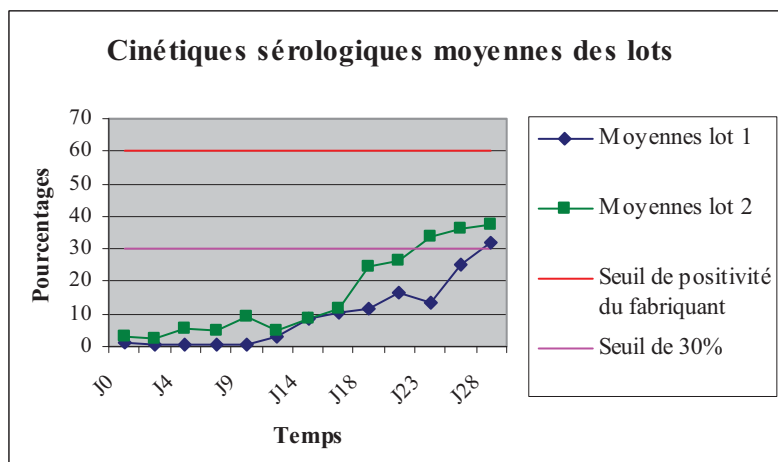


Figure 30 : Cinétique des moyennes arithmétiques des titres sérologiques des brebis des lots 1 et 2

Moy : moyenne
Moyenne la plus élevée

La comparaison date par date des titres sérologiques des brebis des deux lots ne montre pas de différence significative (test t de Student, p compris entre 0,17 et 0,99).

Les moyennes arithmétiques des titres du lot 2 sont toujours supérieures à celles du lot 1. L'écart entre ces deux séries de valeurs est relativement faible jusqu'au 3 décembre (J16) inclus, puis augmente considérablement du 5 (J18) au 12 décembre (J25) pour finalement se rapprocher le dernier jour de l'expérience (J28). La différence entre la moyenne des titres maximale et la moyenne des titres minimale est plus importante pour le lot 2 (34,94) que pour le lot 1 (31,26) mais ces 2 chiffres sont proches.

Au seuil de 30%, les moyennes arithmétiques des deux lots sont positives : le lot 1 devient positif au dernier jour d'expérimentation (J28), tandis que le lot 2 l'est plus précocement (dès J23).

3.2.3- Etude du seuil :

Dans cette partie, nous discuterons des valeurs du seuil de positivité à partir des résultats du laboratoire B car c'est, comme nous l'avons dit précédemment un laboratoire réalisant couramment des analyses de routine pour les vétérinaires libéraux ou les acteurs du GDS. C'est donc à ce laboratoire qu'ont à faire les principaux acteurs de la filière ovine. Nous avons donc choisi de nous placer dans les conditions du terrain. Les valeurs du laboratoire A seront donc utilisées ici à titre de comparaison ou de référence.

Au laboratoire B, le seuil du fabricant était logiquement appliqué : 60%. Les animaux dont les pourcentages sont inférieurs sont considérés séronégatifs et ceux dont les pourcentages sont supérieurs ou égaux à 60% sont considérés séropositifs. Contrairement au laboratoire A, le statut douteux n'existe pas. En abaissant ce seuil, on augmente la sensibilité du test : on peut dépister plus d'animaux positifs ou les dépister plus précocement au cours de leur séroconversion. Cependant, le risque majeur de ce changement est de diminuer la spécificité du test et de voir apparaître des « faux positifs ».

Tableau 46 : Statuts sérologiques des brebis en fonction des seuils de positivité (données du laboratoireB)

Brebis Dates	1037	3044	2006	1059	2015	3012	3065	1067	2023	3004
	Groupe 1					Groupe 2				
17/11	0,3	1,3	3,4	0,6	0	0,4	11,7	0,1	0,6	2,5
19/11	0,1	0,4	1,4	1,1	0	0,2	7,5	0,4	0,5	3,2
21/11	0	0,4	0,9	0,6	0	0,3	20,9	0,8	1,4	2,8
24/11	0,2	0,7	1,3	0	0	0,8	18,3	1	1,2	3,8
26/11	0,6	0,4	1,8	0,7	0	0,7	30,5	2,8	6,3	4,4
28/11	11,1	0,4	2	0,9	0	1,1	14,9	1	5,9	2,9
01/12	36,2	0,4	4,6	0,9	0,08	8,2	11,7	8,1	10,1	4,5
03/12	42,1	0,8	8,2	0,3	0	12,6	11,8	8,1	6,9	18,2
05/12	44,1	1,7	10,6	0,9	0	18,5	13,1	18,1	8,3	66
08/12	33,5	34,3	10,6	3,9	1,6	16,1	16,7	23,6	7,6	69
10/12	41,6	9,8	9,5	5,8	1,9	13	24,5	42,3	15,3	75
12/12	64	34,2	12,1	12,7	2,4	13,5	34,1	38,1	6,5	88
15/12	66	51,8	21,6	18,5	0,3	19,3	39,9	34,5	11,8	81

Séronégative, Séropositive pour seuil à 30%, Séropositive pour seuil à 35%, Séropositive pour seuil à 40%, Séropositive pour seuil à 50%, Séropositive pour seuil à 60%.

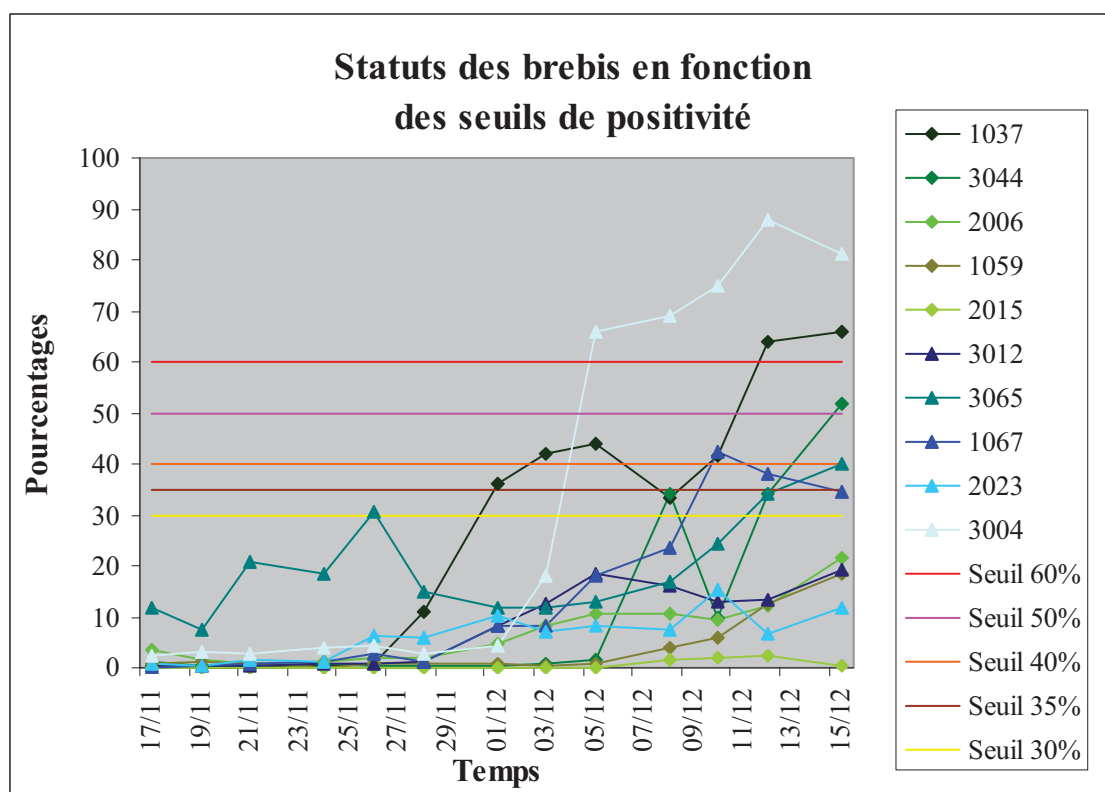


Figure 31 : Statuts sérologiques des brebis des lots 1 et 2 en fonction du seuil de positivité

Tableau 47 : Statuts sérologiques des brebis en fonction des seuils de positivité (données du laboratoire A)

Dates	1037	3044	2006	1059	2015	3012	3065	1067	2023	3004
	Groupe 1					Groupe 2				
17/11	1	1,1	2,3	1	1,3	1,1	20,9	4,1	1,8	6,5
19/11	0,9	1,1	2,5	1	0,8	1,2	17,6	1,1	1,6	5,8
21/11	2,4	1,3	2,6	1,1	0,9	1,4	23,8	0,9	2,3	5,3
24/11	1,2	1,1	3	1,6	0	0,9	31,3	0,3	2,1	6,1
26/11	2,4	1,3	2,9	1,4	0,1	8,3	27,1	2,9	10,9	6,7
28/11	14,8	1,3	4,4	1,2	0,1	13	31,1	3,6	25,3	6,4
01/12	55,3	1,8	13,4	1,7	0,4	21,9	25,2	15,3	24,3	10,7
03/12	52,4	1,8	17	2	0,3	31,6	28,4	21	24,5	30,2
05/12	66,9	2,3	21,3	1,9	0	43,7	30	26,4	20,9	61,7
08/12	57,5	4,9	23,3	2,8	0,6	39,5	36,5	36,4	17,9	64,4
10/12	64	14,4	21,9	9,2	0,9	32,1	39,2	38,6	21,9	73,4
12/12	66,7	46,1	24,2	23,5	0,7	28	32,9	36,9	22,5	76,7
15/12	80,1	74,6	28,5	30,7	0,6	25,9	39,7	43,1	18,3	93,9

Séronégative, Séropositive pour seuil à 30%, Séropositive pour seuil à 35%, Séropositive pour seuil à 40%, Séropositive pour seuil à 50%, Séropositive pour seuil à 60%.

4- Discussion

4.1- Discussion des méthodes

4.1.1-Sélection et gestion des animaux

L'un des facteurs essentiels pour que les résultats d'une étude soient interprétables est la constitution de lots homogènes et surtout équivalents. Tous les animaux ayant participé à cette expérience étaient des brebis de races Lacaune âgées de 2 à 4 ans (donc aucune en première lactation) provenant du même élevage. Il y a donc une bonne homogénéité entre les différents animaux de cette étude.

Parmi toutes les brebis initialement reçues, les 26 mises-bas se sont étalées sur 45 jours ce qui représente une durée importante. Cependant, la grande majorité d'entre elles (88%) s'est faite sur un mois. De plus, il convient de souligner que les dates moyennes de mise-bas des 3 lots sont très proches (26 octobre pour le lot 1, 30 octobre pour le lot témoin négatif et le lot 2). Les brebis des différents lots étaient donc en moyenne au même stade physiologique au moment de l'expérience. Elles étaient toutes en début de lactation, période favorable à la traduction de l'infection.

Les conditions de logement et l'alimentation étaient strictement les mêmes entre les différents lots. D'un point de vue opérationnel, l'ajout de concentré à l'alimentation des brebis avait pour but de permettre un bon démarrage de la production de lait et de sociabiliser les animaux pour faciliter le travail des opérateurs.

Nous pouvons donc dire que les 3 lots sont équivalents.

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre « matériel et méthodes », les agneaux sont restés avec leurs mères tout au long de l'expérimentation (exception faite des nuits précédant chaque séance de prélèvements). La présence des agneaux constitue un risque de contamination croisée ou additionnelle à cause des agneaux « voleurs de lait » qui tètent d'autres brebis en plus de leur mère. Cependant, ces conditions expérimentales sont représentatives des conditions réelles du terrain, où le mode d'élevage veut que les agneaux restent avec leur mère en début de lactation.

Un autre facteur important est celui de la taille de l'échantillon, qui doit être suffisante pour que les résultats soient statistiquement représentatifs de la variabilité naturelle. Nous n'avons reçu initialement que 28 brebis, dont 2 sont mortes. Deux autres brebis (2049 et 2010) n'ont agnelé que tardivement et ont de ce fait été incluses au lot témoin. Ensuite, 10 brebis furent sélectionnées pour une autre expérience simultanée. Les 16 animaux restants ont donc été distribués en un lot témoin négatif de 6 animaux et deux lots inoculés de 5

animaux chacun. Nous avons donc des groupes de petite taille et sommes conscients qu'il aurait été préférable de disposer de plus de sujets. Peut-être aurions nous dû faire le choix d'un seul titre d'inoculum avec donc un seul lot expérimental et un lot témoin tous deux de taille plus importante. Cependant, d'autres expériences ont été conduites avec des lots de petite tailles (5 ou 6 individus) [38, 44].

Certains pourraient nous reprocher d'avoir utilisé des Lacaune provenant du bassin Roquefort où des souches de *Ma* ont été isolées, il y a plus de 20 ans, dans certains élevages ovins laitiers n'ayant jamais présenté de symptômes d'agalactie. Ceci pose bien sûr la question du pouvoir pathogène de ces souches, mais aussi de leur pouvoir immunogène. Les brebis auraient pu rencontrer ces souches atypiques de *Ma* qui leur auraient conféré une immunité partielle, faussant ainsi notre étude. Cependant, ceci est très peu probable dans le cas présent car nous nous sommes assurés avant l'inoculation de la négativité des brebis vis-à-vis de *Ma*. En effet, les analyses sérologiques et les bactériologies réalisées sur les écouvillons nasaux et auriculaires, ainsi que sur le lait étaient tous négatifs.

Le principal organe cible de *Ma* étant la mamelle, nous avons procédé, avant inoculation, à un examen clinique rigoureux des brebis et particulièrement de leur mamelle afin que les animaux inoculés soient sains et exempts de tout problème mammaire. Il semble évident que l'idéal aurait été de ne sélectionner que des animaux en parfaite santé, dépourvus de mammite clinique ou sub-clinique et présentant des bactériologies non spécifiques négatives sur le lait. La présence d'infections mammaires subcliniques constitue un biais possible pour les mesures de productions laitières et les comptages de cellules somatiques (objet d'une autre thèse), ainsi que pour l'excrétion de *Ma*. En effet, les infections intramammaires préexistantes (colibacilles, staphylocoques coagulase négatifs...) augmentent la filtration sanguine au site de l'inflammation et la diapédèse des neutrophiles, favorisant peut-être ainsi la colonisation de la mamelle par des mycoplasmes. Ce facteur n'a, par contre, a priori pas d'influence sur les résultats sérologiques.

Compte tenu du peu d'animaux dont nous disposions au départ, il nous a été impossible de ne garder que des brebis saines. Cependant, afin de limiter au maximum les biais occasionnés par la présence de mammites (cliniques ou sub-cliniques) chez les brebis (coinfections), nous avons préférentiellement mis les animaux atteints et ceux pour lesquels nous ne disposions d'aucune donnée bactériologique (pour cause d'agnelage tardif) dans le groupe témoin (tableau 11). Les germes isolés dans le lait étaient principalement des staphylocoques à coagulase négative qui, contrairement à *Staphylococcus aureus* agent de

mammites cliniques, sont décrits comme les premiers agents de mammites subcliniques chez les ovins avec une prévalence moyenne évaluée à 79% [41]. La prévalence des staphylocoques à coagulase négative dans notre expérience était donc inférieure à la prévalence française moyenne. Les streptocoques sont souvent à l'origine de mammites subcliniques [41].

4.1.2- Inoculation

Nous avons choisi d'inoculer la souche PG2 (à différents titres), qui est la souche internationale de référence de *Ma*, aux brebis des lots 1 et 2. Cette souche est certes modérément pathogène, mais elle est très bien connue sur le plan physiopathologique et surtout moléculaire. Nous aurions pu choisir d'inoculer une autre souche telle que P89 qui est une souche provenant des Pyrénées-Atlantiques [38].

L'inoculation de *Ma* a été faite par voie sous-cutanée. Dans les conditions naturelles, cette voie de contamination ne joue qu'un très faible rôle comparé à l'importance de la voie mammaire pour les femelles en lactation et de la voie orale pour les nouveau-nés (Cf 2.5.2). Cependant, ce mode d'inoculation a été largement testé pour d'autres bactéries telles que *Brucella abortus* ou *Salmonella abortusovis* [38]. Des études antérieures à la nôtre [38, 44] ont porté sur l'utilisation de l'inoculation sous-cutanée en modèle expérimental et ont montré que cette voie permet de provoquer les symptômes, des lésions, une séroconversion et une excrétion de *Ma*. L'une de ces études tend à prouver que la séroconversion et l'excrétion de *Ma* sont plus tardive après une inoculation conjonctivale qu'après une inoculation intra-nasale [44]. Par contre, la voie sous-cutanée semble plus adaptée que la voie intra-mammaire pour suivre les premières étapes de l'infection [38]. En outre, la voie sous-cutanée présente des avantages pratiques (facilité, rapidité, reproductibilité). De plus, cette voie permet d'obtenir une infection générale et d'être parfaitement sûr du titre inoculé contrairement à la voie oculaire, par exemple, pour laquelle il y a des risques de perte. Enfin, l'existence de modèles expérimentaux d'inoculation par voie sous-cutanée est un pré-requis indispensable pour la recherche de vaccins contre l'agalactie contagieuse, vaccins qui s'administrent pour la plupart par injection.

La même souche de *Ma* (PG2) a été inoculée à deux lots d'animaux à différents titres (10^3 UFC au lot 1 et 10^5 UFC au lot 2) afin de rechercher si un « effet titre » est observable dans les conditions de notre expérimentation, et s par la suite, il était possible de choisir un titre faible, plus proche des conditions naturelles. Une étude française a testé

l'inoculation sous-cutanée de *Ma* à des agneaux à trois titres différents (10^5 , 10^7 et 10^9 UFC) et montre que la dissémination de *Ma* est très précoce à 10^9 UFC, nécessite une multiplication préalable à 10^7 UFC et est réduite mais possible à 10^5 UFC. Cette même étude choisit la dose de 10^7 UFC comme modèle [38]. En comparaison de cette expérience, les titres que nous avons choisis semblent faibles, ce qui explique que les tableaux cliniques, sérologiques et bactériologiques que nous avons obtenus soient peu marqués. Cependant, ces titres sont proches de ceux transmis lors d'infections naturelles. La mise en place d'un troisième lot à 10^7 UFC aurait sans doute éclairé nos résultats.

4.1.3- Plan expérimental

Notre expérimentation a duré 29 jours : du 17 novembre 2008 (J0) au 15 décembre 2008 (J28). Cette durée d'expérience est trop courte compte tenu de la voie d'inoculation (sous-cutanée) et des titres (10^3 UFC au lot 1 et 10^5 UFC au lot 2) choisis.

En effet, une phase de plateau (ou de décroissance) des titres sérologiques ne peut être observée que pour 4 des 10 brebis inoculées (2015, 1067, 2023 et 3004). Les cinétiques sérologiques des 6 brebis restantes, ainsi que les cinétiques sérologiques moyennes des lots sont en cours d'augmentation au dernier jour de prélèvement (J28), puisque c'est à cette date qu'elles atteignent leur titre maximum.

De plus, il est connu que lors d'inoculations sous-cutanées, la séroconversion est longue à se mettre en place. Une étude, par exemple, n'obtient de séropositivité en moyenne que 35 jours post injection [44]. Une autre étude montre que pour des titres modérés ou faibles (inférieurs ou égaux à 10^7 UFC) une multiplication locale des bactéries précède la bactériémie et donc la séroconversion et l'excrétion [38].

4.1.4- ELISA

Les analyses sérologiques ont été faites au moyen d'une trousse ELISA recombinant P48 actuellement commercialisée en France (kit Idexx-Pourquier). Tous les articles s'accordent à dire que cet ELISA présente une excellente spécificité (qui approche 100%) [45, 46]. Cependant, certaines études soulignent un défaut de sensibilité : certaines études l'estiment à 56,7% [45], d'autres à 75,8% [46]. Pour augmenter le nombre d'animaux « vrais positifs » détectés, nous aurions dû compléter notre étude sérologique par l'utilisation d'un test ELISA recombinant plus complet, polyprotéique. Un test ELISA recombinant basé sur P80 et P55 permettrait d'obtenir une meilleure sensibilité [47].

Nos cinétiques n'étant relatives qu'aux anticorps anti-P48, elles doivent être considérées comme des résultats par défaut : les titres seraient potentiellement plus importants avec un cocktail de protéines immunogènes.

Concernant l'attribution des statuts sérologiques aux brebis, nous nous sommes bien entendu basés en partie sur les seuils indiqués par le fabricant : douteux si le titre est supérieur à 50%, positif s'il est supérieur à 60%. Cependant, ces seuils ne sont pas définitivement validés et des études récentes montrent que le seuil de 30% est plus juste et plus adapté aux conditions épidémiologiques ovines que nous connaissons en France [Bergonier, communication personnelle]. Nous avons donc également pris ce seuil en compte.

Comme nous l'avons dit précédemment, les échantillons de sang ont été analysés par deux laboratoires français différents : le laboratoire A est un laboratoire de recherche, le laboratoire B est un laboratoire d'analyse de routine auquel les différents acteurs de la filière ovine font couramment appel. Ces deux laboratoires ont utilisé les mêmes sérums qu'ils ont analysés avec la même trousse. Seuls les opérateurs, les lots de réactifs, et les automates ayant réalisé les analyses diffèrent. Pour étudier des caractéristiques sérologiques des brebis, nous avons choisi d'utiliser principalement les résultats du laboratoire B. Ces résultats sont en moyenne moins élevés que ceux du laboratoire A et certaines fluctuations non confirmées par le second laboratoire. Cependant, notre volonté est de coller au maximum aux conditions de terrain : ceci explique notre choix.

4.2- Discussion des résultats

4.2.1- Infection

Le premier objectif de notre étude était de reproduire expérimentalement une infection à *Ma* chez des brebis laitières par inoculation sous-cutanée. La présence d'une infection peut être objectivée par une séroconversion, une excrétion ou par la présence de signes cliniques et de lésions caractéristiques de la maladie.

Les résultats des bactériologies mycoplasmiques (tableaux 12 et 13) montrent la présence (ponctuelle ou durable, sur une ou deux hémi-mamelles) de mycoplasmes dans le lait de 8 des 10 brebis inoculées. Pour 3 de ces huit brebis, la bactériologie n'est qu'une fois faiblement positive sur une seule hémi-mamelle pouvant laisser penser à un faux positif. Cependant, pour les 5 autres brebis, l'excrétion est précoce et/ou durable et/ou bilatérale. De ce point de vue là, on peut donc considérer qu'il y a bien eu infection pour au moins 5 animaux.

Les résultats sérologiques sont quant à eux plus délicats à interpréter étant donné les différences existant entre les données des laboratoires A et B. De plus, l'absence de seuil de positivité unanimement accepté rend difficile l'attribution d'un statut clairement séropositif ou séronégatif aux brebis. Malgré ceci, deux brebis sont considérées séropositives par les deux laboratoires au seuil du fabricant (tableau 32) : celles-ci ont donc séroconverti. De plus, 5 brebis ont des titres supérieurs à 30% (résultats du laboratoire B) et sont donc considérées séropositives à ce seuil. La moyenne arithmétique des titres du lot 1 est supérieure à 30% le dernier jour de l'expérience ; celle du lot 2 l'est dès J23 jusqu'à la fin (J28). Il semble donc que nous ayons réussi à reproduire une infection par inoculation sous-cutanée de *Ma*.

L'étude des signes cliniques et des lésions observés sur les brebis de cette expérience a fait l'objet d'une autre thèse (Bressolin, 2011). Aucun symptôme d'agalactie contagieuse (signes oculaires, articulaires, respiratoires) n'a été observé sur les agneaux des brebis de notre expérience. Les brebis n'ont jamais développé de symptômes oculaires, respiratoires ou articulaires. Certaines femelles ont subi des chutes de productions lactées, mais celles-ci étaient concomitantes au développement de mammites non mycoplasmiques.

Bien que nous n'ayons pas réussi à induire les symptômes de l'agalactie contagieuse, nous avons reproduit une infection au moins sur une partie des brebis.

4.2.2- Bactériologie

Concernant les bactériologies mycoplasmiques, les brebis des groupes 1 et 2 se répartissent en 3 groupes quel que soit le titre de leur inoculum, c'est-à-dire quel que soit leur lot initial :

- des brebis présentant une excrétion précoce, durable et bilatérale (3 brebis) : 3044, 2015 et 3004 ;
- des brebis ayant une excrétion tardive et éphémère sur une seule hémimamelle (6 brebis) : 1037, 2006, 1059, 3012, 3065 et 1067
- et enfin une brebis (2023) n'ayant jamais excrété de mycoplasme pendant la durée de cette expérience.

Les trois brebis présentant une excrétion mycoplasmique précoce, durable et bilatérale montrent des bactériologies non spécifiques positives : la 3044 avec *Escherichia coli* à gauche et un staphylocoque coagulase négatif à droite, la 2015 avec un Staphylocoque coagulase négatif sur les deux hémimamelles et la 3004 avec un Staphylocoque coagulase négatif à gauche. De plus, la brebis 3044 est considérée séropositive au seuil de 30% par le laboratoire

B et au seuil de 60% par le A. La 3004 est séropositive au seuil du fabricant d'après les deux laboratoires. Ces deux brebis ont donc été infectées et ont excrété des mycoplasmes dans le lait. La présence de mammites sub-cliniques chez ces brebis a probablement favorisé l'excrétion de mycoplasmes du fait de l'afflux de neutrophiles dans la mamelle dont certains pourraient contenir des mycoplasmes et de l'augmentation de la filtration sanguine au site de l'inflammation. On remarque d'ailleurs que la seule brebis à n'avoir jamais excrété de mycoplasmes n'a présenté que des bactériologies classiques négatives. Ses titres sérologiques ne dépassent jamais le seuil de 30% (pour les deux laboratoires). Parmi les brebis présentant une excrétion mycoplasmaïque brève, tardive et unilatérale, 66% n'ont eu que des bactériologies non spécifiques négatives (1037, 1059, 3012 et 3065).

4.2.3- Sérologie

4.2.3.1- Reproductibilité : variabilité inter-laboratoires

La moyenne des pourcentages de toutes les brebis obtenue par le laboratoire A est toujours supérieure à celle donnée par le laboratoire B. De plus, sur 130 prélèvements envoyés aux deux laboratoires, 110 obtiennent des valeurs supérieures au laboratoire A par rapport à celles obtenues au laboratoire B (soit 84,62% des prélèvements). Enfin, de manière générale, plus les pourcentages sont élevés, plus l'écart entre les valeurs données par le laboratoire A et celles données par le laboratoire B augmente.

Les coefficients de corrélation entre les valeurs des deux laboratoires pour l'ensemble des brebis varient entre 0,314 (pour la brebis 2015, ce qui est bas et plutôt mauvais) et 0,989 (pour la brebis 1059, ce qui est très proche de 1 et montre que les valeurs des deux laboratoires sont proches). Le coefficient de corrélation du lot 1 (0,988) est meilleur que celui du lot 2 (0,953). Le coefficient de corrélation est supérieur à 0,9 pour 60% des brebis ce qui montre que l'écart moyen entre les résultats des deux laboratoires est acceptable pour le praticien.

Nous allons étudier les statuts des brebis en fonction du laboratoire d'envoi des prélèvements avec le seuil du fabricant (60%).

Pour 8 des 10 brebis, le laboratoire d'analyse des échantillons ne change rien à leur statut sérologique aux seuils du fabricant. En effet, même si les pourcentages donnés par les deux laboratoires sont parfois différents, les brebis 2006, 1059, 2015, 3012, 3065, 1067 et 2023 sont toujours séronégatives. De même, d'après les deux laboratoires, la brebis 3004 est séronégative jusqu'au 3 décembre et séropositive à partir du 5 décembre. Dans de tels cas, le

laboratoire d'analyse auquel le vétérinaire praticien envoie les prélèvements qu'il a réalisés pour dépister l'agalactie contagieuse ou pour confirmer une suspicion de cas clinique n'influe pas sur les résultats qu'il obtiendra ni sur l'interprétation qu'il en fera. Ses décisions ultérieures et leurs conséquences sur l'élevage d'origine des brebis ne varieront pas en fonction du laboratoire d'analyse où sont envoyés les prélèvements.

Cependant les deux laboratoires attribuent des statuts sérologiques différents à 2 brebis du lot 1 (avec les seuils du fabricant) : la 1037 et la 3044. Au contraire, entre J14 et J23, les statuts sérologiques attribués à cette brebis par les laboratoires A et B sont différents : le laboratoire A la décrit comme douteuse ou positive tandis que le laboratoire B la considère négative. La brebis 3044 est toujours déclarée séronégative par le laboratoire B alors qu'elle est séropositive en fin d'expérience pour le laboratoire A.

C'est dans de tels cas que les différences de résultats ont une réelle importance en pratique pour le vétérinaire et l'éleveur. En effet, le statut de la brebis n'étant pas le même dans les 2 cas, les décisions prises quant à l'animal et au cheptel ne seront pas les mêmes.

Le laboratoire d'envoi des prélèvements ne semble pas poser de problèmes pour les brebis qui sont clairement négatives avec des valeurs basses ni pour les brebis qui sont très nettement positives avec des valeurs hautes. C'est surtout pour les animaux ayant des pourcentages intermédiaires que les laboratoires donnent des résultats différents.

Avec le seuil de 30%, récemment validé dans les Pyrénées Atlantiques (Bergonier, Communication personnelle), 5 des 10 brebis (1037, 3044, 2006, 2015 et 2023) ont exactement les mêmes statuts quelque soit le laboratoire d'analyse. Deux brebis (1059 et 3012) sont décrites comme séropositives par le laboratoire A et séronégatives par le B. Enfin, les trois autres brebis sont considérées séropositives plus tôt par le laboratoire A que par le B.

4.2.3.2- Discussion du seuil

Un premier groupe peut être fait avec les animaux qui sont séronégatifs même avec un seuil bas. Pour les brebis dont les pourcentages sont constamment bas (<20%) à très bas, abaisser le seuil de positivité ne change rien à leur statut : elles restent toujours séronégatives même à un seuil de 30%. C'est le cas des brebis : 2006, 1059, 2015 et 2023. Tous les animaux du lot témoin négatif peuvent bien sûr être inclus dans ce groupe.

Les brebis 2023 et 2006 ont toutes deux des courbes de profil sérologique très plates, dépourvues de pic. De plus, elles restent séronégatives même à un seuil de 30% pour le laboratoire A. Enfin, les résultats de leurs bactériologies mycoplasmiennes sur lait sont

toujours négatifs (sauf un résultat douteux pour la 2006) : elles n'excrètent jamais de mycoplasmes. Ces deux brebis sont sans aucun doute des « vraies négatives ».

La brebis 1059 présente une courbe de profil sérologique plate qui n'augmente que très peu en toute fin d'expérience. En outre, en abaissant le seuil à 30%, elle n'est qu'une seule fois considérée séropositive avec les résultats du laboratoire A. Enfin, elle ne présente qu'une seule fois une bactériologie mycoplasmaïque positive et ce sur une seule hémimamelle : pouvant s'agir d'une contamination (par l'environnement ou par un autre agneau par exemple), il n'est pas possible de conclure de façon certaine à une réelle excrétion.

La brebis 2015 présente une courbe de profil sérologique très plate et très basse. Quelque soit le seuil, elle est séronégative avec les résultats du laboratoire A. Cependant, cette brebis présente des bactériologies mycoplasmaïques positives sur ces deux hémimamelles à partir du 10 décembre (J23) et ce jusqu'à la fin de l'expérience.

La brebis 3012 quant à elle présente une courbe plate en début d'expérience, qui augmente par la suite pour atteindre un plateau autour des 20%. Avec les résultats du laboratoire A, elle est considérée positive 2 fois au seuil de 30%, 1 fois au seuil de 35% et 1 fois même au seuil de 40%. Une de ses bactériologies mycoplasmaïques est positive sur une hémimamelle.

Considérons maintenant un deuxième groupe de brebis : celui des animaux déjà considérés positifs au seuil de 60% avec les données du laboratoire B. Il s'agit des brebis 1037 et 3004.

Concernant la brebis 3004, le fait d'abaisser le seuil jusqu'à 30% (et même jusqu'à 20%) n'a aucun impact sur la précocité de détection de son statut « séropositif ». On observe en effet un saut dans ses valeurs qui passent de 18,2% le 3 décembre (J16) à 66% le 5 décembre (J18). Avec les valeurs du laboratoire A, l'abaissement du seuil à 30% ne rajoute qu'une seule valeur positive. Cette brebis a d'ailleurs une courbe de profil sérologique qui présente un pic très marqué. En outre, ses bactériologies mycoplasmaïques sont positives de manière bilatérale, précoce (dès le 24 novembre, J7) et durable (jusqu'à la fin de l'expérience, J28).

Au contraire, pour la brebis 1037, le fait d'abaisser plus ou moins le seuil de positivité a un réel impact sur la précocité de détection de sa séropositivité. Avec un seuil de positivité à 60%, elle n'est positive que le 12 (J25) et le 15 décembre (J28). Avec un seuil de positivité à 40%, elle l'est aussi les 3, 5 et 10 décembre (J16, J18 et J23) et avec un seuil à 35%, elle est positive à partir du 1^{er} décembre (J14). On retrouve alors un statut semblable à celui donné

par le laboratoire A pour qui la brebis est douteuse à positive à partir du 1^{er} décembre (J14). Cet animal a une seule bactériologie positive en mycoplasmes.

Nous allons maintenant étudier un troisième groupe de brebis, constitué par les brebis considérées comme négatives avec un seuil de positivité de 60% et positives en abaissant le seuil. Ce groupe comprend les brebis 3044, 3065, 2006 et 1067.

Pour la brebis 3044, si le seuil de positivité est de 50%, elle est positive le 15 décembre (J28 : 51,8%) : cela coïncide parfaitement avec les résultats du laboratoire A pour qui elle est positive à cette même date. En abaissant encore le seuil (à 30%), elle est positive les 8 (J21) et 12 décembre (J25). Son profil sérologique est une courbe qui montre un pic très net. En outre, cet animal a des bactériologies positives sur le lait de sa mamelle gauche dès le 28 novembre (de J11 jusqu'à J28, fin de l'expérience) et sur sa mamelle droite les 10 et 15 décembre. Cette brebis a donc très certainement été infectée par *Ma* : elle a séroconverti et a excrété : l'abaissement du seuil de 60 à 50% permet de la dépister.

La brebis 3065 devient positive le 15 décembre (J28) si on ramène le seuil à 35%, et en plus le 26 novembre (J9) et le 12 décembre (J25) si le seuil est de 30%.

Le seuil de 60% est trop élevé, ce qui diminue la sensibilité du test. Bien que la taille de nos échantillons soit trop faible pour l'affirmer avec certitude, nos résultats semblent confirmer le choix du seuil de 30%.

Conclusion

L'objectif de notre travail était d'évaluer la possibilité de reproduction expérimentale de l'Agalactie contagieuse sur brebis en lactation en tentant d'obtenir une infection générale, un tableau aussi proche que possible de l'Agalactie naturelle et des modifications biologiques induites aisément quantifiables. Nous souhaitons en effet pouvoir utiliser ce modèle, en appliquant un protocole standardisé d'inoculation, à la comparaison du pouvoir pathogène de souches ou à l'évaluation de la protection conférée par diverses préparations immunogènes. L'objectif de la présente thèse, au sein de ce travail global, était de comparer excrétion galactophore de *Mycoplasma agalactiae* et cinétiques sérologiques ELISA P48, en fonction du titre mycoplasmaïque inoculé (10^3 ou 10^5 UFC).

La première conclusion ressortant de ce travail est relative au résultat clinique et infectieux obtenu. En inoculant, dans les conditions décrites au chapitre matériel et méthodes, 10^3 ou 10^5 UFC de la souche PG2 à des brebis Lacaune en lactation, nous n'avons pas reproduit de symptômes cliniques physiques ou fonctionnels nets. De plus, l'excrétion galactophore induite a été majoritairement « tardive », unilatérale et brève (sur un mois de suivi). Le lot inoculé à 10^5 UFC n'a d'ailleurs présenté d'augmentation significativement supérieure au lot inoculé à 10^3 UFC ni pour les critères cliniques, ni pour les critères bactériologiques, ni pour les critères fonctionnels.

Ainsi, une infection générale n'a pas été reproduite chez tous les animaux, et l'ensemble des paramètres cliniques ou biologiques qui semblent utilisables pour caractériser des effets induits ne peut être retenu ici dans le cadre de la problématique exposée. Des recommandations, pour l'amélioration de cette modélisation expérimentale ont été données dans l'autre partie du présent travail (thèse d'Aude Bressolin, ENVT, 2011). Elles portent principalement sur l'augmentation des titres inoculés et/ou le changement de voie d'inoculation.

La deuxième conclusion porte sur les cinétiques sérologiques obtenues en technique ELISA recombinante monoprotéique P48. En moyenne de lot d'inoculation, les brebis ayant reçu 10^3 UFC présentent une séropositivité (au seuil de 30%) à J25, alors que les brebis ayant reçu 10^5 UFC la présentent à J17. Il s'agit du seul marqueur de l'infection, si l'on regroupe les deux volets de ce travail, dont les résultats sont en accord avec la différence de charge des inocula. Par ailleurs, les valeurs sérologiques obtenues restent basses, par rapport à la littérature, pendant et à la fin de l'expérimentation (en moyenne inférieures au seuil du fabricant).

Cette différence sérologique inter-lots paraît donc confirmer la réalité d'une stimulation antigénique supérieure pour le lot 10^5 UFC, alors qu'elle n'est nullement apparue pour les critères directs (bactériémie, excrétion mammaire) ou cliniques. L'explication pourrait être recherchée dans la voie d'inoculation et/ou dans l'état physiologique des bactéries lors des injections sous-cutanées (sans parler de la durée du suivi). A l'opposé, les conditions qui paraissent favorables à la traduction de ces infections artificielles étaient le stade physiologique des brebis (début de lactation), la présence d'agneaux pouvant être à l'origine de recontaminations, voire la race.

L'ensemble de ces résultats est cependant en accord avec la bibliographie qui souligne la relative difficulté générale à reproduire des tableaux cliniques et des positivations sérologiques fortes. Il est donc logique qu'en travaillant avec des inocula inférieurs aux études publiées nous confirmions cette tendance.

Il convient enfin de souligner que ces cinétiques sérologiques ont été obtenues avec la seule trousse ELISA commercialisée en France au moment de l'expérimentation (ELISA recombinant P48). Celle-ci n'utilisant qu'une protéine à l'immunogénicité non comparée aux autres protéines de surface reconnues par l'hôte, souffre selon la littérature d'un défaut de sensibilité. A l'avenir, ne pouvant recourir à des ELISA à antigène total, en général trop peu spécifiques, la perspective reste la mise au point de trousse permettant la détection des anticorps dirigés contre plusieurs protéines fortement immunogènes sélectionnées de façon raisonnée pour leur complémentarité en matière de reconnaissance au cours des différents stades de l'infection.

L'objectif plus large des travaux scientifiques actuels est de permettre une différenciation entre ces anticorps naturels et les anticorps induits par des vaccins de nouvelle génération.

Bibliographie

[1] ROSENVAL S.

Pathogenesis of bacterial infections in animals
25, 297-311

[2] LE GRAND D., ARCANGIOLI M-A., CALAVAS D., BEZILLE P., POUMARAT F.

Mycoplasmes et mycoplasmoses : actualités
Bull. Acad. Vét. France, 2008, Tome 161, N°2 (www.academie-veterinaire-defrance.org),
159-166.

[3] RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C, GAY, C.C.

Veterinary Medicine. 8e édition. London : Baillière Tindall, 1124-1127

[4] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE ANIMALE (OIE)

(page consultée le 8 juin 2009). Ancienne classification des maladies notifiables à l'OIE.
Adresse URL : http://www.oie.int/fr/maladies/fr_oldclassification.htm

[5] DEPARTEMENT EMVT DU CIRAD

(page consultée le 8 juin 2009). Péripleurmonie contagieuse bovine.
Adresse URL : http://agriculture.gouv.fr/guide_epizooties/monographies/f-ppcb.htm

[6] WIKIPEDIA

(page consultée de 13 juin 2009). Maladie
Adresse URL : <http://wikipedia.org/wiki/maladie>

[7] BERGONIER D., BERTHELOT X.

Mycoplasmoses des petits-ruminants : le syndrome de l'agalactie contagieuse
Bull. Acad. Vét. France, 2008, Tome 161, N°2 (www.academie-veterinaire-defrance.org) :
167-177

[8] MADANAT A. , ZENDULKOVA D., POSPI Z.

Contagious Agalactia of Sheep and Goats.
A Review. Acta Vet. Brno, 2001, **70**, 403-412.

[9] CORRALES J.C., ESNAL A., DE LA FE C., et al.

Contagious agalactia in small ruminants
Small Ruminant Research, 2007, **68**, 154–166.

[10] BERGONIER D., BERTHELOT X. et POUMARAT F.

Agalactie contagieuse des petits ruminants : connaissances actuelles sur l'épidémiologie, le diagnostic et le contrôle
Rev. Sci. Tech. int. Epiz. , **16** (3), 849-873.

[11] BERGONIER D.

L'agalactie contagieuse : principal syndrome mycoplasémique des petits ruminants
Cours donné à l'ENVET, Toulouse, France, 2008

[12] Manuel de l'OIE 2005, chapitre 2.4.3, 672-680

[13] AFSSA, Mycoplasmes et faune sauvage

[14] DIALLO M., CISSE O., NIANG M., DOUCOURE M., KONE M., SCHALCH L., NICOLET J., ROTH J.

Enquête sérologique de l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* chez les petits ruminants au Mali

Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 2003, **56** (1-2) : 17-20

[15] MADANAT A., ZENDULKOVA D., LANY P., POSPI Z., et al.

Prevalence of *Mycoplasma agalactiae* Antibodies in Czech and Jordanian Herds of Small Ruminants

Acta Vet. Brno, 2002, **71**, 37–44.

[16] NOUVEL L-X.

Etude de la diversité génétique de *Mycoplasma agalactiae* : plasticité des génomes, mobilome et dynamique de surface

Th. : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition, Université de Toulouse : l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 2009

[17] BERGONIER D.

Etude de la variabilité intraspécifique de *Mycoplasma agalactiae*. Bases pour l'amélioration du diagnostic de l'Agalactie Contagieuse.

Thèse d'Université, Université Claude Bernard, Lyon, France, 1996

[18] WIKIPEDIA

(page consultée le 20 octobre 2009). Biofilm

Adresse URL : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Biofilm>

[19] REFDOC.FR

(page consultée le 20 octobre 2009)

Adresse URL : <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2611584>

[20] BIOFILMS

(page consultée le 20 octobre 2009)

Adresse URL : http://www.chargedesecurite.ch/EST_Presentation_biofilm_bacterien.ppt

[21] AFSSA

Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la lutte contre l'agalactie contagieuse en Pyrénées-Atlantiques

Maisons-Alfort, le 10 février 2010

[22] BONNEFIN N.

Comparaison de la souche 7784 hypovirulente de *Mycoplasma agalactiae* à la souche type virulente PG2 par la technique d'hybridation soustractive suppressive

Th. : Med. vet. : Toulouse : 2003 : 4154 ; 94

[23] BERGONIER D., BERTHELOT X., POUMARAT F.

Mycoplasmoses des caprins et des ovins : état des connaissances sur le diagnostic et le traitement

Congrès GTV, Nantes, France

[24] TOLA S., MANUNTA D., ROCCA S., ROCCHIGIANI A. M., IDINI G., ANGIOI P. P., LEORI G.

Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines
Vaccine, 1999, **17**, 2764-2768.

[25] ANTUNES N.T. , TAY M.M., ASSUNCAO P., ROSALES R.S., POVEDA C., DE LA FE' C., GIL M.C., POVEDA J.B.

In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*
The Veterinary Journal, 2008, **177**, 436–438.

[26] CHAZELM., TARDY F., POUMARAT F.

Method for isolating *Mycoplasma* spp. In ruminants
Cahiers de la Référence, 2009, **2**, 19-21.

[27] DUPHOT V.

Agalactie contagieuse des petits ruminants : une maladie à la maîtrise difficile mais payante
La dépêche vétérinaire, 2008, **984**

[28] TOLA S., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., LEORI G.

Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction
Veterinary Microbiology, 1996, **51**, 77-84.

[29]] TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G., LEORI G. :

Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction
Veterinary Microbiology, 1997, **54**, 17-22.

[30] FUSCO M., CORONA L., ONNI T., MARRAS E., LONGHEU C., IDINI G., TOLA S.

Development of a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Recombinant Antigens for Rapid Detection of Antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in Sheep

Clinical and vaccine immunology, 2007, 420-425.

[31] POUMARAT F., LE GRAND D., BERGONIER D.

Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique.
Point Vet., 1996, **28**, 180, 761-769.

[32] RAZIN S.

Molecular properties of *Mollicutes* : a synopsis. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 1, edited by Razin and Tully, Academic Press, New York, 1995 : 1-25.

[33] RAZIN S., YOGEV D., NAOT Y.

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998, **62** (4), 1094-1156.

[34] KHAN LA., MILES R., NICHOLAS R.A.J.

Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effects of *in vitro* passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high level of H₂O₂

Veterinary research communications, 2005, **29**, 181-188.

- [35] ROSENGARTEN R., CTTI C., GLEW M., LISCHEWSKI A., DROESSE M., MUCH P., WINNER F., BRANK M., SPERGSER J.
Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis : virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes.
Int. J. Med. Microbiol., 2000, **290**, 15-25.
- [36] WIKIPEDIA
(page consultée le 16 juin 2010). Incidence.
Adresse URL : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Incidence_\(%C3%A9pid%C3%A9miologie\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Incidence_(%C3%A9pid%C3%A9miologie))
- [37] WIKIPEDIA
(page consultée le 16 juin 2010). Prévalence.
Adresse URL : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%A9valence>
- [38] SANCHIS R., ABADIE G., LAMBERT M., CABASSE E., GUIBERT J.M., CALAMEL M., DUFOUR P., VITU C., VIGNONI M., PEPIN M.
Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs
Small Ruminant Research, 1998, **27**, 31-39.
- [39] POUMARAT F., CHAZEL M., TARDY F., GAURIVAUD P., ARCANGIOLI M-A, LE GRAND D., CALAVAS D.
VIGIMYC, le réseau national d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants, bilan 2003-2007
Bulletin épidémiologique de l'AFSSA, 2009, **31**, 4-6.
- [40] BLANCHARD A., CITTI C., THIAUCOURT F.
Contrôle des mycoplasmoses des ruminants
INRA-CIRAD-Myco070227
- [41] ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT
(page consultée le 24 juin 2010). Les mammites des petits ruminants.
Adresse URL : etudiant.vetalfort.fr/.../mammitite/mammitesubclinique/mammitesubcliniqueov.htm –
- [42] PERRIN J-L., Pages « biotechnologies et bioanalyses »
(page consultée le 20 octobre 2010). Reproductibilité.
Adresse URL : <http://www.perrin33.com/incertitudes/iso5725-2/repetrepro.html>
- [43] SANCHIS R., ABADIE G., LAMBERT M., CABASSE E., DUFOUR P., GUIBERT J, PÉPIN M.
Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains
Vet. Res., 2000, **31**, 329–337.
- [44] BUONAVOGLIA D., FASANELLA A., GRECO G., PRATELLI A.
A study on an experimental infection of sheep with *Mycoplasma agalactiae*
Microbiologica, 1999, **22**, 27-30.
- [45] KITTELBERGER R., O'KEEFE JS., MEYNELL R., SEWELL M., ROATI S., LAMBERT M., DUFOUR P., PEPIN M.

Comparison of four diagnostic tests or the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*
NZ vet journal, 2006, 54, 5-10.

[46] PEPIN M., DUFOUR P., LAMBERT M., AUBERT M., VAGNOLES A., ROTIS T., VAN DE WIELE A., BERGONIER D.

Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep
J Vet Diagn Invest, 2003, 15, 281-285.

[47] FUSCO M., CORONA L., ONNI T., MARRAS E., LONGHEU C., IDINI G., TOLA S.

Development of a sensitive and specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in sheep
Clinical and vaccine immunology, 2007, 420-425.

Annexes :

Annexe 1 : Formule du milieu d'Eaton (Manuel de l'OIE 2005) :

« Dissoudre 21 g de bouillon ordinaire « Becton Dickinson (Oxford, UK) PPLO » (pour *Pleuropneumonia-Like Organisms*) (sans cristal violet) dans 700 ml d'eau distillée. A ce bouillon PPLO, ajouter 100 ml d'extrait de levure préparé extemporanément, 200 ml de sérum de cheval non chauffé, 1 g de glucose, 0,5 ml d'ampicilline (20 000 Unités Internationales [UI]/ml), et 12,5 ml de rouge de phénol à 0,2 %. Ajuster le pH entre 7,6 et 7,8 et stériliser par filtration. Préparer du milieu solide en ajoutant 10 g de gélose LabM n°1 (Bury, UK) ou de la gélose de qualité équivalente et répartir en boîtes de Pétri stériles. »

Annexe 2 : Protocole d'ensemencement (Manuel de l'OIE):

« i) Faire des dilutions de dix en dix (10¹–10⁶) du prélèvement liquide (lait, liquide synovial) ou du prélèvement de tissu homogénéisé (ou écouvillons de l'oeil ou des oreilles) dans du milieu liquide.

ii) Etaler quelques gouttes de chaque prélèvement sur le milieu solide et réaliser une dilution à 10 % (v/v) dans le milieu liquide.

iii) Ensemencer les écouvillons directement sur le milieu solide.

iv) Incuber les bouillons (avec une agitation lente) et les boîtes de Petri inoculés à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂.

v) Examiner les bouillons chaque jour pour rechercher les signes d'une croissance bactérienne (indiquée par un léger trouble et/ou une opalescence) ou les modifications de pH révélées par un changement de couleur ; examiner selon la même fréquence les boîtes de Petri avec une loupe binoculaire d'agrandissement x35 pour rechercher la morphologie caractéristique des colonies de mycoplasmes « en oeuf sur le plat ».

vi) Si aucune croissance due à un mycoplasme n'est observée au bout de 7 jours, faire une sous-culture à 10 % (v/v) du bouillon dans un bouillon frais et étaler environ 50 µl de ce bouillon sur milieu solide.

vii) Répéter comme à l'étape v). Si aucun mycoplasme n'est visible au-delà de 21 jours de culture, considérer le prélèvement comme négatif.

viii) Si une contamination bactérienne importante est décelée (vue par une turbidité excessive), filtrer le bouillon contaminé en passant 1 ml de ce bouillon au travers un filtre de 0,45 µm et inoculer un bouillon frais. »

Annexe 3 : examen clinique et bactériologique de la mamelle des brebis, traitements mis en place

Brebis	Examen clinique mamelle	Bactériologie	Traitement
1010	Morte		
1014	Euthanasiée		
2039	Normal	0	
5049	Normal	0	
5054	Normal	0	
1027	Normal	0	
2035	Non observé	0	
3019	Normal	0	
4002	NLR bilatéral+pustule	SCN droite	Cobactan®LA 2 fois
2004	Kyste	0	
4006	Normal	0	
7	Normal	0	
1037	Staph cutané en guérison	0	
3044	Normal	0	
206	Normal	0	
1059	Normal	0	
2015	Normal	SCN gauche et droite	Cobactan®LA 2 fois
3012	Normal	0	
3065	1 grumeau à gauche	0	
1067	NLR	SCN gauche	Cobactan®LA 2 fois
2023	Normal	0	
3004	Non observé	SCN gauche	Cobactan®LA 2 fois
36	Lait modifié + petits abcès +induration diffuse à droite	E-coli	
3024	Normal	E-coli droite	Cobactan®LA 3 fois
2014	Kyste lacté+abcès à droite	E-coli gauche+SCN droite	Cobactan®LA 3 fois
1033	Grumeaux + induration diffuse en parasagittal à gauche	SCN droite	Cobactan®LA 2 fois
2049	Normal	0	
2010	Normal	0	

- 0 : bactériologie négative, aucun germe trouvé
- SCN : staphylocoques à coagulase négative
- E-coli : colibacilles
- NLR : nœud lymphatique rétromammaire augmenté
- Staph : Staphylocoques

Toulouse, 2011

NOM : SEGURET

PRENOMS : Anne-Claire, Hélène, Marie-Jeanne

TITRE : Excrétion galactophore et cinétiques sérologiques après inoculation de brebis en lactation par *Mycoplasma agalactiae*.

RESUME :

Dans le contexte de l'extension du foyer basque d'Agalactie contagieuse ovine à *Mycoplasma agalactiae*, il était nécessaire d'évaluer des modèles expérimentaux sur l'hôte naturel en lactation afin de pouvoir comparer les effets de l'inoculation de diverses préparations antigéniques et/ou immunogènes.

L'inoculation de deux lots de cinq brebis Lacaune par voie sous-cutanée avec respectivement 10^3 et 10^5 UFC de la souche de référence PG2 n'a pas produit de symptomatologie nette. L'infection induite a donné majoritairement lieu à une excrétion galactophore brève et unilatérale, ainsi qu'à une séropositivité tardive et faible (ELISA monoprotéique). La reproductibilité de cette technique et les cinétiques sérologiques obtenues en fonction du titre bactérien inoculé sont discutées.

MOTS-CLES :

Mycoplasmes / Agalactie contagieuse / brebis / ELISA / inoculation

ENGLISH TITLE : Milk shedding and serological kinetics after inoculation of lactating ewes by *Mycoplasma agalactiae*

ABSTRACT :

In the context of spreading out of the Basque ovine Contagious Agalactia outbreak due to *Mycoplasma agalactiae*, it was necessary to assess models of disease experimental production in natural host in order to being able to compare the effects of various antigenic and/or protective preparations.

The inoculation of two lots of five Lacaune-breed sheep by subcutaneous route with respectively 10^3 and 10^5 CFU of the reference strain PG2 did not produce any clear symptomatology. The induced infection mainly produced a short and unilateral milk shedding as well as a late and weak seropositivation (monoproteic ELISA). The reproducibility of this technique and the induced serological kinetics are discussed.

KEY WORDS :

Mycoplasma / Contagious Agalactia / ewes / ELISA / inoculation