

COMPARAISON *IN VIVO* DE L'EFFET AGALACTOGENE DE SURNAGEANTS DE CULTURE DE DEUX MYCOPLASMES

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Guillaume, Philippe HABERT

Né, le 31 août 1977 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : M. le Docteur Dominique BERGONIER

JURY

PRESIDENT :

M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Dominique BERGONIER

M. Xavier BERTHELOT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	:	M.	G. BONNES
Directeurs honoraires.....	:	M.	R. FLORIO
		M.	R. LAUTIE
		M.	J. FERNEY
		M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	:	M.	A. BRIZARD
		M.	L. FALIU
		M.	C. LABIE
		M.	C. PAVAU
		M.	F. LESCURE
		M.	A. RICO
		M.	A. CAZIEUX
		Mme	V. BURGAT
		M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
Mlle **HAY Magali**, *Zootechne*
M. **MARENDI Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

Remerciements,

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur DABERNAT

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Bactériologie-Virologie
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur BERGONIER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la Reproduction
En remerciement pour son enseignement, son aide précieuse dans ce travail et ses conseils.

Monsieur le Professeur BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la Reproduction
En remerciement pour son enseignement et pour avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

A mes parents,

A ma famille,

A mes amis.

SOMMAIRE

	Pages
Index des tableaux	13
Index des graphes	15
Introduction	17
1 ^{ère} Partie : Etude bibliographique	18
1. Caractères généraux des mycoplasmes	21
1.1. La classification	21
1.2. Les caractères principaux	21
1.2.1. Les caractères morphologiques et génétiques	21
1.2.2. Les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire	22
1.2.3. Les mycoplasmes et leurs hôtes	24
1.2.4. Les facteurs pathogènes des mycoplasmes	25
2. L'agalactie contagieuse des petits ruminants	27
2.1. Importance	27
2.2. Etiologie	27
2.3. Les tableaux cliniques	28
2.3.1. La clinique provoquée par <i>Mycoplasma agalactiae</i>	28
2.3.2. La clinique provoquée par <i>M. mycoides mycoides</i> LC	28
2.3.3. La clinique provoquée par <i>M. capricolum capricolum</i>	29
2.3.4. La clinique provoquée par <i>M. putrefaciens</i>	30
2.4. Epidémiologie	30
2.4.1. Epidémiologie descriptive	30
2.4.2. Epidémiologie analytique	31
2.5. Diagnostic	32
2.5.1. Diagnostic bactériologique	32
2.5.2. Diagnostic sérologique	32
3. La pathologie due à <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	34

3.1. Importance	34
3.2. Etiologie	34
3.3. Les animaux atteints	34
3.4. Les tableaux cliniques	34
3.4.1. Chez le poulet	34
3.4.2. Chez la dinde	35
3.5. La transmission	35
2 ^{ème} Partie : L'expérimentation animale	37
1. Principes et objectifs	39
2. Matériel et méthodes	40
2.1. Matériel d'étude : les animaux	40
2.1.1. Origine et devenir des animaux	40
2.1.2. Critères de sélection des brebis	40
2.1.3. Réalisation des trois lots de l'expérimentation	43
2.2. Matériel d'étude : les deux inoculums	44
2.2.1. Les cultures starters	44
2.2.2. Le repiquage des cultures en grands volumes	44
2.2.3. Reprise des préparations et réalisation des inoculums	44
2.2.4. Protocole de dénombrement des cultures en grands volumes	45
2.2.5. Vérification de la stérilité des inoculums	45
2.3. Les méthodes de travail	45
2.3.1. L'inoculation	45
2.3.2. Les paramètres mesurés	45
2.3.2.1. Examens cliniques	46
2.3.2.2. Prélèvements	46
2.3.2.3. Production laitière	46
2.3.2.4. Les techniques d'analyses utilisées	46
3. Résultats	48
3.1. Présentation des résultats	48
3.2. L'évolution des températures rectales	48
3.3. Les examens cliniques	48
3.4. La production laitière	50
3.4.1. Courbe des moyennes de production	50

3.4.2. Courbe des ratios	51
3.5. L'aspect du lait	54
4. Discussion	55
4.1. Validité du matériel et des méthodes	55
4.1.1. Choix du matériel d'étude : les brebis	55
4.1.2. Choix des effectifs	55
4.1.3. Choix de la voie d'inoculation	56
4.1.4. Choix des cultures de bactéries	56
4.1.5. Choix de la conduite de troupeau	56
4.2. Analyse des résultats	57
4.2.1. Validité de l'expérimentation	57
4.2.2. Le lot testé : le lot <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	58
4.2.3. Influence du titre initial des cultures	58
4.3. Interprétation des résultats	59
4.4. Perspectives	59
Conclusion	61
Annexes	63
Bibliographie	71

TABLEAUX

	Pages
Tableau 1 : Les différentes espèces de mycoplasmes pour lesquelles l'existence de système antigénique hypervariable a été démontrée.	23
Tableau 2 : Les mycoplasmes isolés chez les animaux.	24
Tableau 3 : Caractères étiologiques et épidémiologiques de l'agalactie contagieuse dans plusieurs pays.	31
Tableau 4 : Méthode de calcul de l'indice sérologique de troupeau.	33
Tableau 5 : La production laitière de chaque demi-mamelle des brebis des trois lots.	41
Tableau 6 : Le comptage cellulaire somatique des demi-mamelles des brebis.	42
Tableau 7 : Composition des trois lots.	43
Tableau 8 : Réalisation des volumes des trois cultures.	44
Tableau 9 : Résultats des palpations des nœuds lymphatiques rétromammaires.	49
Tableau 10 : Effectifs des lots lors des expérimentations précédentes à l'ENVV.	55
Tableau 11 : Quelques références bibliographiques d'inoculations intra-mammaires de mycoplasmes.	56
Tableau 12 : Comparaison des hypogalacties provoquées par le surnageant de <i>Mycoplasma agalactiae</i> entre trois manipulations réalisées à l'ENVV.	57

GRAPHES

	Pages
Graphe 1 : Evolution des températures rectales des brebis des lots témoins milieu et <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .	48
Graphe 2 : Evolution dans le temps des indurations notées sur les demi-mamelles inoculées.	50
Graphe 3 : Production au cours du temps des deux demi-mamelles de la brebis témoin milieu.	50
Graphe 4 : Production moyenne au cours du temps des demi-mamelles non inoculées des deux lots.	51
Graphe 5 : Production moyenne au cours du temps des demi-mamelles inoculées des deux lots.	51
Graphe 6 : Evolution des ratios côté inoculé sur côté non inoculé pour les trois lots au cours du temps.	53

INTRODUCTION

L'agalactie contagieuse est une pathologie majeure des petits ruminants affectant en particulier la glande mammaire. Elle sévit aujourd'hui un peu partout dans le monde, mais reste localisée dans certaines régions en France. Afin de pouvoir améliorer la lutte contre cette maladie, des recherches sont menées depuis plusieurs années pour identifier les déterminants du pouvoir pathogène de l'agent infectieux et pour, à terme, proposer un candidat vaccin. Pour ce faire, au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, des expérimentations sont réalisées à l'aide de surnageants de culture du principal agent responsable de l'agalactie contagieuse ovine : *Mycoplasma agalactiae*. En effet, plusieurs séries d'inoculation par voie intra-mammaire de surnageants ont montré précédemment l'induction d'une chute brutale et partielle de la production laitière, accompagnée d'une inflammation locale.

En 2000, nous avons effectué une nouvelle manipulation, en premier, lieu pour confirmer les résultats obtenus auparavant ; les objectifs de cette expérimentation étaient cependant principalement de connaître la spécificité de l'effet du surnageant de *M. agalactiae* sur la mamelle par rapport à d'autres mycoplasmes. De cette mise en évidence pourra découler d'autres manipulations pour définir plus précisément la nature biochimique des composés actifs du surnageant : traitement des surnageants par des protéases, des lipases ou d'autres agents.

Dans une première partie, nous présenterons la maladie étudiée ainsi que l'autre mycoplasme ayant servi à l'expérimentation en tant que témoin : *Mycoplasma gallisepticum*.

Dans la deuxième partie, nous décrirons l'expérimentation réalisée en 2000, puis nous analyserons les résultats pour les comparer à ceux obtenus précédemment.

1^{ère} PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractères généraux des mycoplasmes :

1.1. La classification :

Les mycoplasmes appartiennent à la Classe des Mollicutes et à l'Ordre des Mycoplasmatales.

Au sein de cette Classe, trois genres nous intéressent :

-Le genre *Mycoplasma* : on y trouve environ 85 espèces différentes, leur taille varie entre 0,15 et 0,8 μm . La taille de leur génome se situe entre 600 et 1350 kb. Leur culture nécessite en particulier du cholestérol et leur croissance optimum est à 37°C.

-Le genre *Ureaplasma* : il diffère par leur possibilité d'hydrolyse de l'urée.

Un autre Ordre existe dans cette Classe des Mollicutes : les Acholeplasmatales qui regroupent le genre Acholeplasma.

Ces trois genres comprennent des espèces pathogènes pour les hommes et les animaux .

En fait l'usage a assimilé le terme de mycoplasme à toute la Classe des Mollicutes.

1.2. Les caractères principaux :

1.2.1. Les caractères morphologiques et génétiques :

La taille limitée :

Les mycoplasmes sont de très petite taille : entre 0.15 et 0.8 μm de diamètre. Ce sont les plus petites bactéries qui existent. De plus, ce sont les plus petits organismes vivants qui sont autonomes pour se reproduire : en effet, les organismes plus petits que sont les virus dépendent de cellules eucaryotes pour leur reproduction.

De même, leur information génétique est très réduite. La taille du génome de *Mycoplasma genitalium* représente environ le cinquième du génome d'*Escherichia coli*. Leur code génétique ne renferme donc qu'environ 500 gènes contre 4000 pour *E. coli*.

Les mycoplasmes ont ainsi « perdu » beaucoup d'information génétique par rapport à leurs ancêtres bactériens et notamment la possibilité de synthétiser plusieurs facteurs de croissance : RAZIN en 1996 et 1997 a démontré que des mycoplasmes (notamment *M. influenzae*) ne peuvent synthétiser certains acides aminés et des acides gras. Les mycoplasmes ne pouvant les produire, ils devront les trouver dans le milieu extérieur ; les mycoplasmes sont ainsi presque toujours des parasites, saprophytes ou commensaux des cellules eucaryotes. De même, les milieux de cultures utilisés doivent comprendre les éléments manquant aux mycoplasmes : ce sont des milieux enrichis à l'aide de sang de cheval par exemple. La croissance des mycoplasmes dans ces milieux est longue et délicate ; un diagnostic bactériologique ciblé sur des mycoplasmes nécessite donc du temps.

Le génome des mycoplasmes possède une autre particularité : le faible teneur en guanine plus cytosine (entre 23 et 40 % seulement). Une conséquence directe de ce faible pourcentage est le problème de la synthèse d'un acide aminé, le tryptophane, qui est codé universellement par l'unique codon UGG. Les mycoplasmes possédant peu de guanine ont un autre codon codant pour le tryptophane : le codon UGA. Cependant ce codon UGA est un codon stop chez tous les autres êtres vivants ; cela représente un problème quand on veut faire synthétiser par *Escherichia coli* une protéine mycoplasmiq, car dès le premier codon UGA, la synthèse s'arrête.

L'absence de paroi :

Les gènes permettant la synthèse de cette paroi commune à toutes les autres bactéries sont absents du génome des mycoplasmes. La barrière entre le cytoplasme et le milieu extérieur est uniquement constituée de la bi-couche lipidique classique de la membrane. Cette absence engendre plusieurs conséquences :

- les mycoplasmes ont une plasticité de forme supérieure aux autres bactéries (car la paroi bactérienne rigide limite cette capacité),
- les mycoplasmes ne survivent que peu de temps dans le milieu extérieur et sont facilement tués par les désinfectants habituels,
- les antibiotiques ayant pour cible la paroi bactérienne, comme les bêta-lactamines, sont bien sûr inactifs sur ces germes,
- les défenses immunitaires de l'hôte sont en contact direct avec la membrane plasmique du mycoplasme.

1.2.2. Les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte :

L'hypothèse actuelle est qu'ils consistent principalement en une hypervariabilité des protéines de surface de la membrane plasmique.

Mise en évidence de ces mécanismes :

Il était déjà supposé que les mycoplasmes présentaient une forte variabilité protéique des surfaces et plusieurs expériences l'ont confirmée *in vitro* : la réalisation d'immunoempreintes sur colonies et des Western Blots.

Les immunoempreintes (WATSON *et al.* 1988 et 1993, ROSENGARTEN *et al.*,1991) : des mycoplasmes d'une même lignée, possédant théoriquement les mêmes épitopes sont mis en culture puis testés grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope (une réaction enzymatique colorée révèle les interactions anticorps-épitope). Après coloration, les colonies apparaissent hétérogènes : certaines sont grises (absence de l'épitope), d'autres noires (présence de l'épitope), enfin beaucoup sont sectorisées, car au sein d'une même colonie, des mycoplasmes ont tour à tour exprimé puis non exprimé et parfois à nouveau exprimé cet épitope. Les mycoplasmes ont ainsi modifié de façon rapide et réversible l'expression de certaines protéines de surface ; un tel mécanisme pourrait permettre d'échapper aux réponses de l'hôte dirigées contre ces protéines.

Les Western Blot : après une lyse des mycoplasmes, une migration des protéines par électrophorèse est réalisée, un anticorps monoclonal est ensuite utilisé afin de mettre en évidence un épitope spécifique. Les résultats montrent que, selon le variant clonal considéré, l'épitope visé peut avoir un poids moléculaire différent.

Il est ainsi montré que les mycoplasmes peuvent soit exprimer, soit ne pas exprimer leurs épitopes et quand ils les expriment, les protéines peuvent varier de poids moléculaire.

Les systèmes existants :

De tels mécanismes ont été démontrés chez une dizaine de mycoplasmes. Parmi eux plusieurs sont des pathogènes pour l'homme ou pour les animaux : voir tableau suivant.

Tableau 1 : les différentes espèces de mycoplasmes pour lesquelles l'existence de système antigéniques membranaires hypervariables a été démontrée.

Espèces	Système existant	Pathologie associée	Références
<i>M. bovis</i>	Plusieurs systèmes dont les vsp(variable surface lipoproteins) (a,b,c,d,e,f) et pMB67	Pneumopathies, arthrites et mammites chez les bovins	BEHRENS <i>et al.</i> 1995 ; 1996 Le GRAND <i>et al.</i> 1996 LYSNYANSKY <i>et al.</i> 1996 ROSENGARTEN <i>et al.</i> 1994
<i>M. agalactiae</i>	Plusieurs systèmes de nature encore indéterminé	Mammites, arthrites et conjonctivites chez les petits ruminants	BERGONIER <i>et al.</i> 1996 SOLSONA <i>et al.</i> 1996
<i>M. imitans</i>	Plusieurs systèmes dont la P41	A déterminer : perdrix, anatidés	ROSENGARTEN <i>et al.</i> 1995
<i>M. gallisepticum</i>	Plusieurs systèmes dont les pMGa (<i>M. gallisepticum</i> adhesines) et PvpA (phase-variant protein), P41	Pneumopathie chronique des volailles	BENSICA <i>et al.</i> 1994 GARCIA <i>et al.</i> 1994 KLEVEN <i>et al.</i> 1994 MARKHAM <i>et al.</i> 1992 ; 1993 ; 1994 PANAGALA <i>et al.</i> 1992 YOGEV <i>et al.</i> 1994
<i>M. hominis</i>	Système Lpm (surface-located membrane protein)	Pathogène opportuniste de l'appareil génital de l'homme	JENSEN <i>et al.</i> 1995 LADEFOGED <i>et al.</i> 1995
<i>M. arthridis</i>	Plusieurs systèmes de natures non complètement définies	Arthrites chroniques de la souris	DROESSE <i>et al.</i> 1995
<i>M. fermentans</i>	Plusieurs systèmes	Pathogène chez les humains immunodéprimés	THEISS <i>et al.</i> 1993 ; 1996
<i>M. genitalium</i>	Probablement adhesines MgPa (<i>M. genitalium</i> protein attachment)	A déterminer, chez l'homme	PETERSON <i>et al.</i> 1995
<i>M. pulmonis</i>	Système V1 (groupe des vsa-vs, variable surface antigens)	Pneumopathie, arthrites et métrites chez la souris	BHUGRA <i>et al.</i> 1992 ; 1995 SIMMONS <i>et al.</i> 1996 WATSON <i>et al.</i> 1988
<i>M. hyorhinis</i>	Système V1ps (variable lipoproteins)	Saprophyte de l'appareil respiratoire du porc, agent d'arthrites chroniques	CITTI <i>et al.</i> 1995 ROSENGARTEN <i>et al.</i> 1990 ; 1991 WISE <i>et al.</i> 1992 ; 1993 YOGEV <i>et al.</i> 1991 ; 1993 ; 1995
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Système MB (multiple banded)	Commensal de l'appareil génital de la femme, pathologie néonatale	WATSON <i>et al.</i> 1993 ZENG <i>et al.</i> 1995

Nous voyons que de nombreuses espèces sont concernées y compris celles qui nous intéressent : *M. gallisepticum* pour lequel les déterminants antigéniques spécifiques sont affectés d'une grande variabilité ; *M. agalactiae* présente une variabilité qui semble plus limitée.

Tous ces systèmes appartenant aux différentes espèces peuvent être regroupés en deux catégories :

- Les systèmes qui utilisent comme variant des lipoprotéines (*M. hyorhinis*, *M. bovis*, *M. gallisepticum*). Ces lipoprotéines ont une partie terminale à l'extérieur de la bactérie qui est constituée d'un motif dont le nombre de répétitions constitue l'élément variant.

- Les systèmes qui utilisent des protéines non liées à des lipides. Ces protéines sont très variables et également très immunogènes.

Les conséquences de ces mécanismes :

La première conséquence est le problème posé pour les diagnostics sérologiques : les anticorps utilisés peuvent cibler des protéines qui varient rapidement et de manière aléatoire (en particulier des anticorps monoclonaux ; le problème étant probablement bien moindre avec les anticorps polyclonaux).

Une autre conséquence tout aussi importante est le problème potentiel de la vaccination : comment protéger correctement des animaux contre des cibles qui ne cessent de se modifier, s'il est montré que ces protéines variables constituent des déterminants du pouvoir pathogène.

1.2.3. Les mycoplasmes et leurs hôtes :

Après avoir supposé que les mycoplasmes avaient une spécificité d'hôte étroite ou stricte, il s'est avéré que cette spécificité est plutôt préférentielle mais non exclusive : des bovins peuvent être contaminés par *M. canis* dont l'hôte habituel est le chien, par exemple. En fait, les mycoplasmes sont adaptés à un hôte spécifique chez lequel ils sont généralement pathogènes ; parfois, ils colonisent un hôte tiers sans toutefois être forcément pathogène.

Tableau 2 : les mycoplasmes isolés chez les animaux (d'après NICOLET, 1996) :

Hôte	Espèces	Agents pathogènes
Primate (sauf humains)	Mycoplasma :12 Acholeplasma :1 Ureaplasma :1	
Ruminants	Mycoplasma :19 Acholeplasma :4 Anaeroplasma :2 Ureaplasma :1	<i>M. mycoides mycoides</i> SC et LC <i>M. agalactiae</i> <i>M. bovis</i> <i>M. capricolum subsp capricolum</i> ...
Porcins	Mycoplasma :13 Acholeplasma : 5 Ureaplasma : 1	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i> <i>M. hyosynoviae</i>
Oiseaux domestiques	Mycoplasma :17 Ureaplasma :2 Acholeplasma :2	<i>M. gallisepticum</i> <i>M. meleagridis</i> <i>M. synoviae</i>

Hôte	Espèces	Agents pathogènes
Equins	Mycoplasma :11 Acholeplasma :8	<i>M. felis</i> <i>M. equirhinis</i>
Chiens et chats	Mycoplasma :15 Acholeplasma :1 Ureaplasma :1	<i>M. canis</i> <i>M. cynos</i> <i>M. felis</i> <i>M. gatae</i>
Animaux de laboratoire	Mycoplasma :11 Acholeplasma :3	<i>M. pulmonis</i> <i>M. arthridis</i>
Animaux sauvages	Mycoplasma :17 Acholeplasma :2 Ureaplasma :1	

Nous nous intéressons maintenant aux mycoplasmoses qui affectent les petits ruminants. Ces mycoplasmoses sont nombreuses et certaines ont une importance considérable. Nous ne parlerons pas des mycoplasmoses dont l'agent n'a pas été identifié.

- Les pathogènes majeurs sont les suivants :

Mycoplasma capricolum capripneumoniae (souche F38) : responsable de la pleuropneumonie contagieuse caprine chez les ovins et surtout les caprins.

M. agalactiae : agent de l'agalactie contagieuse (arthrites, pneumonies, vaginites et kératoconjunctivites chez les ovins et les caprins).

M. mycoides subsp *mycoides* Large Colony : responsable de mammites, d'arthrites, de forte mortalité chez les jeunes.

M. capricolum capricolum : responsable d'arthrites, de mammites et de pneumonies chez les ovins et caprins.

- Les pathogènes modérés :

M. mycoides subsp. *capri* : très probablement à regrouper avec *M. mycoides* subsp *mycoides* LC.

M. putrefaciens : responsable de mammites et d'arthrites chez les caprins.

M. ovipneumoniae : responsable de pneumonie et souvent précurseur de pasteurellose pulmonaire.

- Les mycoplasmes faiblement pathogènes ou opportunistes :

M. arginini : pouvant être responsable de pneumonie, d'arthrite, de vaginite, de kératoconjunctivite et de mammite chez les ovins et caprins.

Acholeplasma laidlawii : bactérie non pathogène trouvée dans les poumons .

1.2.4. Les facteurs pathogènes des mycoplasmes :

La pathogénie des maladies provoquées par les mycoplasmes est connue de façon très incomplète. Seuls quelques éléments viennent nous renseigner sur ce sujet. L'action pathogène des Mollicutes se réalise en deux étapes : l'adhésion à l'aide d'adhésines spécifiques de l'organe cible (la mamelle pour *M. agalactiae*), puis l'intervention de facteurs pathogènes.

Induction de production de cytokines :

En 1996 et 1998, RAWADI *et al.* ont montré que les mycoplasmes peuvent induire la production de nombreuses cytokines par les monocytes et les macrophages. Une origine de cette stimulation a été trouvée : ce sont des lipoprotéines membranaires (de *Mycoplasma fermentans* dans cette expérimentation) qui provoquent la libération de cytokines (IL-6, IL-1beta, TNF-alpha) par un mécanisme qui fait intervenir une tyrosine kinase ; cette enzyme interviendrait après la transcription dans la synthèse des cytokines.

De même, ABUSUGRA *et al.*, 2000, ont montré que les membranes de *Mycoplasma mycoides mycoides* SC sont capables d'induire de fortes synthèses de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α), qui provoquent de fortes inflammations à l'origine de lésions sur les poumons des bovins.

Les membranes des mycoplasmes paraissent ainsi provoquer de violentes inflammations au niveau des organes cibles qui seraient à l'origine des différentes pathologies observées.

Intervention de toxiques :

Des toxiques impliqués dans la pathogénie des Mollicutes appartiennent à la famille des oxydants : radicaux superoxydes, oxyde nitreux, et surtout eau oxygénée. Plusieurs auteurs (VILEI *et al.*, 2001, MILES *et al.*, 1991) ont mis en évidence la production par *M. mycoides* subsp *mycoides* SC de H₂O₂ ; cet agent oxydant est issu de l'oxydation du glycérol par le mycoplasme. MEIER *et al.*, 1990 ont démontré la présence de l'enzyme superoxyde dismutase dans 21 souches de Mollicutes (incluant les acholeplasmes, les mycoplasmes et les ureaplasmes) et une activité de l'enzyme catalase (enzyme dégradant l'H₂O₂) dans 50% des lysats de cultures de Mollicutes ; de plus 8 souches sur les 10 testées produisaient de l'H₂O₂ et de l'O₂⁻ par oxydation du glucose. Tous ces agents oxydants peuvent être libérés à l'extérieur de la bactérie et être à l'origine de troubles au sein du tissu hébergeant les bactéries.

Intervention de toxines putatives :

Aucune toxine *stricto sensu* n'a pu être mise en évidence en ce qui concerne les Mycoplasmes.

Chez *M. agalactiae*, certaines protéines de la famille Vpma sont abondamment retrouvées dans le surnageant de milieu de culture. On ne sait actuellement si ces protéines, hypervariables, sont sécrétées ou simplement libérées, ni quel est leur rôle. Aucun argument ne permet actuellement de démontrer qu'elles représentent des toxines.

2. L'agalactiae contagieuse des petits ruminants :

2.1. Importance :

La distribution et la prévalence de l'agalactie contagieuse, associées à son impact économique, placent cette maladie au deuxième rang d'importance chez les ovins et les caprins, après la Brucellose, dans les pays méditerranéens.

En France, des foyers enzootiques persistent avec une expression clinique variable, dans cinq départements dont les Pyrénées-Atlantiques et la Savoie. Par ailleurs, des cas sporadiques, fréquents, sont enregistrés un peu partout sur le territoire, en fonction de la densité des populations ovines et caprines (Poitou-Charentes et Centre principalement).

L'impact socio-économique est important à l'échelon d'un élevage touché sporadiquement, car il n'existe dans ce cas ni moyen de lutte efficace, ni programme national ou local d'indemnisation.

Il est plus préoccupant à l'échelon des filières touchées sous forme enzootique : dans les Pyrénées-Atlantiques par exemple, l'agalactie contagieuse constitue une entrave majeure au développement de la filière ovine laitière, malgré l'application d'un programme de prophylaxie (coût annuel d'environ 10MF en 1997).

L'abattage total des troupeaux atteints, mesure-clé du programme de lutte, est à l'origine de pertes financières, mais également génétiques : le nombre important d'ovins abattus dans ce département, excédant 9000 en 1994, fragilise le schéma de sélection.

D'un point de vue réglementaire, l'agalactie contagieuse n'est pas une Maladie Légalement Réputée Contagieuse (MLRC). Elle fait partie de la liste B de l'OIE (Office International des Epizooties). Elle est cependant à déclaration obligatoire dans plusieurs pays européens.

Localement, la France est probablement le seul pays à avoir développé, avec l'appui de la Direction Générale de l'Alimentation, des programmes départementaux de prophylaxie sanitaire : l'agalactie contagieuse est une maladie réglementée par des arrêtés préfectoraux.

2.2. Etiologie :

Même si de nombreux mycoplasmes ont été isolés des mamelles des petits ruminants, tous ne sont pas pathogènes.

En ce qui concerne l'agalactie contagieuse, quatre mycoplasmes peuvent intervenir. Pour induire la pathologie, il ne faut pas nécessairement la présence de plusieurs de ces mycoplasmes car une espèce à elle seule peut provoquer l'agalactie contagieuse.

Les agents en cause sont les suivants :

- Mycoplasma agalactiae* : il représente l'agent « classique » de l'agalactie contagieuse.
- Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony.
- Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*.
- Mycoplasma putrefaciens*.

2.3. Les tableaux cliniques :

2.3.1. La clinique provoquée par *M. agalactiae* :

Les petits ruminants peuvent développer plusieurs formes cliniques suite à leur contamination :

La forme typique :

Les ovins ont des formes cliniques plutôt subaiguës à chroniques, alors que les caprins ont des formes cliniques plus aiguës.

Après l'apparition d'un syndrome fébrile de courte durée, les animaux présentent un ensemble de signes cliniques évocateurs :

- une hypogalactie passagère voire une agalactie totale et brutale s'installe ainsi qu'une mammites parenchymateuse ou catarrhale, unie ou bilatérale(lait modifié, apparition de foyers d'induration ou d'abcédation au sein de la glande mammaire, nœuds lymphatiques rétro-mammaires réactionnels) ;
- des arthrites ou des polyarthrites principalement localisées au niveau des tarses et des carpes ; leur sévérité est variable, allant de la simple boiterie à l'ankylose et au décubitus ;
- une kératoconjonctivite peut apparaître.

Ces trois premiers signes cliniques sont prépondérants, d'autres moins fréquents peuvent être présents : des avortements en fin de gestation, des troubles respiratoires.

La prédominance d'un trouble par rapport à l'autre varie en fonction de l'espèce, de l'âge et du stade de lactation : chez les jeunes, on observe surtout des troubles respiratoires, des arthrites voire des kératoconjonctivites ; les adultes en lactation présentent principalement les troubles liés à la mamelle (hypogalactie,...) ; les adultes en dehors de la période de lactation ont surtout des arthrites et des kératoconjonctivites.

De même, la morbidité et la mortalité varient beaucoup : les adultes en dehors de la période de lactation sont peu atteints : 0-20% de morbidité et 0-3% de mortalité ; par contre les jeunes sont les plus touchés, principalement les chevreaux : 10-70% de morbidité et 3-50% de mortalité pour les chevreaux ; pour les femelles en lactation, les chèvres sont là aussi plus atteintes que les brebis : jusqu'à 90% de malades et 40% de mortalité.

Les formes « atypiques » :

Concernant plutôt les caprins, ces formes se caractérisent par une atteinte de l'appareil génital (vulvo-vaginite granuleuse chez les femelles) ou de l'appareil respiratoire : pleuropneumonie. Ces formes sont beaucoup plus rares, et pas encore décrites, en France.

2.3.2. La clinique provoquée par *M. mycoides* subsp *mycoides* LC :

Ici aussi, on rencontre deux formes de la maladie : typique et atypique. Les caprins sont plus souvent touchés que les ovins.

La forme typique :

Ce mycoplasme peut être plus pathogène que *M. agalactiae*, car des mammites sévères sont décrites, avec des agalacties et une mortalité importante : jusqu'à 50% pour la chèvre. Les autres signes sont des polyarthrites plus fréquentes qu'avec *M. agalactiae* et des troubles respiratoires là aussi plus fréquents. Par contre les problèmes oculaires sont moins nombreux.

Les ovins peuvent également présenter des broncho-pneumonies ou des pleurésies induisant jusqu'à 60% de mortalité.

Les chevreaux ont des troubles articulaires, pulmonaires et parfois nerveux avec une forte mortalité : de 10 à 95 %.

La forme « atypique » :

Uniquement décrite en Afrique et en Australie jusqu'à présent, cette forme concerne les ovins adultes qui présentent des vulvovaginites et des balanoposthites.

2.3.3. La clinique provoquée par *M. capricolum* subsp *capricolum* :

Cette sous-espèce affecte principalement les caprins, mais les ovins peuvent présenter des formes subcliniques ou cliniques. Les bovins et caprins sauvages sont exceptionnellement atteints. Tout comme *M. mycoides* subsp *mycoides* LC, les syndromes peuvent être très destructeurs et la symptomatologie est variable.

La forme typique :

Chez les adultes, deux grands types de syndromes ont été décrits selon la localisation géographique.

En Europe et en Australie, ce mycoplasme est connu pour induire un syndrome caractéristique de l'agalactie contagieuse : surtout des arthrites et polyarthrites séreuses ou fibrineuses qui peuvent être sévères ; une atteinte de la glande mammaire avec une hypogalactie ou une agalactie ; les kératoconjonctivites sont peu fréquentes ainsi que les troubles respiratoires.

Dans d'autres pays, notamment au Maroc, les descriptions sont différentes : les problèmes respiratoires sont ici prépondérants chez les caprins et les ovins ; on trouve aussi des kératoconjonctivites chez les ovins ainsi que des arthrites et des mammites chez les caprins.

Des avortements peuvent être présents dans les deux cas.

Toutes les formes intermédiaires entre ces deux descriptions sont possibles.

Chez les jeunes, un état fébrile s'installe rapidement pouvant conduire à la mort : entre 10 et 98% de mortalité pour les chevreaux. Les symptômes sont les suivants : arthrites, kératoconjonctivites, troubles respiratoires et nerveux.

La forme « atypique » :

Elle est constituée de problèmes des organes reproducteurs : vulvovaginites et balanoposthites.

2.3.4. La clinique provoquée par *M. putrefaciens* :

Ce mycoplasme atteint aussi préférentiellement les caprins, mais les ovins peuvent être touchés.

Jusqu'en 1987, *M. putrefaciens* était considéré comme un agent faiblement pathogène de mammite contagieuse caprine : une seule demi-mamelle atteinte, peu d'hypogalactie. Un foyer aux Etats-Unis d'Amérique en 1987 a changé cette perception : rapportant de nombreux symptômes : mammite, agalactie, arthrites, avortements, forte morbidité (90% dans ce foyer) et forte mortalité (700 caprins morts). Des cas de ce type, ou moins sévères ont été depuis régulièrement observés.

L'effet pathogène de ce mycoplasme sur les poumons n'a pas été clairement démontré. Aucune atteinte oculaire n'a été décrite.

2.4. Epidémiologie :

2.4.1. Epidémiologie descriptive :

L'agalactie sévit actuellement sur tous les continents et des isollements ou des cas cliniques ont été rapportés dans plus de 55 pays. Les pays d'Europe centrale et du pourtour méditerranéen au sens large sont fortement atteints. *Mycoplasma agalactiae* est le mycoplasme qui a la plus forte prévalence dans la majorité des pays du bassin méditerranéen. *Mycoplasma putrefaciens* est à l'origine de foyers dont l'extension est plus limitée : Etats-Unis, Espagne, Egypte, France,...

Au niveau mondial, c'est *Mycoplasma agalactiae* qui constitue la dominante étiologique pour les ovins ; pour les caprins, c'est *M. mycoides mycoides* LC. En Afrique, *M. capricolum capricolum* a une importance considérable.

En France, il existe deux zones d'enzootie résiduelle à *M. agalactiae* : les Pyrénées-Atlantiques et les Savoies. Ces foyers sont anciens et actuellement restreints à quelques vallées ou quelques estives. Les foyers sporadiques sont quant à eux présents régulièrement dans diverses autres régions d'élevage. *Mycoplasma putrefaciens* est en France un agent étiologique important chez les caprins.

Les associations de mycoplasmes ne sont pas exceptionnelles pour les caprins : *M. mycoides mycoides* LC est souvent l'un des deux agents, *Mycoplasma agalactiae* est souvent le deuxième.

Le tableau suivant présente les caractéristiques étiologiques et épidémiologiques de l'agalactie contagieuse dans plusieurs pays.

Tableau 3 : caractéristiques étiologiques et épidémiologiques de l'agalactie contagieuse dans plusieurs pays. BERGONNIER *et al.*, 1997.

Pays	Mycoplasme	Extension géographique	Forme épidémiologique	Espèces hôtes
France	<i>M. a</i>	Limitée	Enzootie	Ov, Cp
	<i>M. mm LC</i>	Non limitée	Cas sporadiques	Cp
	<i>M. cc</i>	Non limitée	Cas sporadiques	Cp
	<i>M. p</i>	Non limitée	Cas sporadiques	Cp
Espagne	<i>M. a</i>	Non limitée	Enzootie	Ov, Cp
	<i>M. mm LC</i>	Non limitée ou méconnue	Cas sporadiques	Cp, (Ov)
	<i>M. cc</i>	Non limitée ou méconnue	Cas sporadiques	Cp,(Ov)
	<i>M. p</i>	Non limitée ou méconnue	Cas sporadiques	Cp
Portugal	<i>M. a</i>	Non limitée	Enzootie	Ov, Cp
	<i>M. mm LC</i>	Non limitée ou méconnue	Cas sporadiques	Cp
	<i>M. cc</i>	Non limitée ou méconnue	Cas sporadiques	Cp
Suisse	<i>M. a</i>	Limitée	Enzootie (actuellement assainie)	Cp, Ov
Etats-Unis	<i>M. mm LC</i>	Non limitée ou méconnue	Enzootie	Cp
	<i>M. cc</i>	Limitée	Cas sporadiques	Cp , (Ov)
	<i>M. p</i>	Limitée	Cas sporadiques	Cp
	<i>M. a</i>	Limitée	Cas sporadiques	Cp
Maroc	<i>M. cc</i>	Non limitée ou méconnue	Enzootie	Ov, Cp
	<i>M. a</i>	Non limitée ou méconnue	Enzootie	Cp, Ov

2.4.2. Epidémiologie analytique :

Les animaux représentent la source principale de bactéries car les mycoplasmes sont très peu résistants dans le milieu extérieur et beaucoup de produits désinfectants sont efficaces sur eux. L'excrétion de mycoplasmes précède très souvent l'apparition des signes cliniques et atteint son maximum lors de la phase clinique. L'excrétion se réalise par plusieurs voies : lait, larmes, sécrétions ou jetage respiratoire, fèces, urine, produit pathologique articulaire, sécrétions utéro-vaginales ou génitales mâles. Une fois l'animal guéri, celui-ci peut encore excréter des mycoplasmes dans le milieu extérieur pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois ; cela concerne surtout les femelles en lactation. Chez la chèvre, les oreilles constituent un site privilégié au sein duquel on peut trouver facilement les quatre mycoplasmes.

Les principales voies de pénétration des mycoplasmes dans les conditions naturelles sont orale, respiratoire et mammaire.

Les voies de contamination oculaires et vaginales ne semblent pas avoir d'importance épidémiologique réelle.

La transmission verticale a été longtemps supposée et n'est pas à écarter, car l'appareil génital est très souvent contaminé ; cependant la contamination du nouveau-né a beaucoup plus souvent lieu lors de la tétée pour les ovins.

La transmission horizontale prédomine largement pour les quatre mycoplasmes ; elle est le plus souvent directe, même si elle peut avoir lieu lors de la traite mécanique ou être permise par des vecteurs (acariens des oreilles des chèvres principalement).

2.5. Diagnostic :

Nous avons vu que les formes cliniques et épidémiologiques de l'agalactie contagieuse peuvent être très variées, le diagnostic de certitude ne sera donc pas établi après l'unique examen clinique : il faut recourir à des examens complémentaires.

2.5.1. Diagnostic bactériologique :

Les prélèvements :

En cas de présence de symptômes, les prélèvements à réaliser intéressent les organes atteints : le lait à prélever avec une asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination du prélèvement, le liquide synovial des articulations, un écouvillonnage oculaire des culs-de-sac conjonctivaux en cas de kératoconjunctivite.

Si aucun signe clinique n'est présent, à l'échelon individuel comme à l'échelon collectif, le lait est le prélèvement de choix, qu'il soit prélevé individuellement ou dans le tank pour une recherche sur le troupeau. L'écouvillonnage des conduits auditifs externes des chèvres est aussi un élément important pour déceler les porteurs.

L'isolement :

Pour cultiver ces mycoplasmes, il faut des milieux spécifiques enrichis avec du sérum de cheval et de la levure de bière en particulier. Pour qu'il soit sélectif, on ajoute de l'acétate de thallium et de la pénicilline qui sont inactifs sur les mycoplasmes.

L'identification :

Il existe l'identification traditionnelle, fondée sur des tests biochimiques mais qui ne permettent pas de conclure spécifiquement ; il faut ajouter des tests d'inhibition de croissance spécifiques. C'est une technique longue et laborieuse qui est peu à peu abandonnée.

Actuellement, sont utilisés des tests ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay) directs avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Il se développe aussi actuellement les tests d'amplification génique ou PCR qui peuvent être très sensibles.

2.5.2. Le diagnostic sérologique :

Diverses techniques ont été testées mais seulement deux sont utilisées : la fixation du complément et l'ELISA.

La fixation du complément, utilisée dès les années 1970, est délicate à mettre en œuvre si on veut arriver à un niveau élevé de fiabilité. Elle est surtout utile pour une aide au diagnostic de l'agalactie contagieuse au niveau des troupeaux et non au niveau individuel, car la persistance des anticorps sériques peut dépasser plusieurs mois voire un an.

La technique ELISA, utilisée dès 1982, est plus sensible que la fixation du complément, elle est aussi employée au niveau de troupeaux et non de l'animal. Pour simplifier l'interprétation, un indice sérologique a été créé pour qualifier les troupeaux testés : des tests ELISA sont réalisés sur une vingtaine d'animaux du troupeau puis le calcul de

l'indice nous donne une indication sur le statut du troupeau en entier. Le tableau suivant nous indique la méthode de calcul de cet indice.

Tableau 4 : Méthode de calcul de l'indice sérologique d'après LEBRET *et al.*, 1995 :

Valeurs individuelles	Nombre d'animaux	Calcul d'indice	Résultat de l'indice	Qualification du troupeau
< 150 UI	A	$I=B+5C+25D$	$I<4$	Indemne
150-299 UI	B		$4<I<63$	Présumé indemne
300-599 UI	C		$64<I<127$	Agalactie latente
> 600 UI	D		$I>128$	Agalactie contagieuse

3. La pathologie due à *Mycoplasma gallisepticum*

3.1. Importance :

Mycoplasma gallisepticum est l'agent responsable de la maladie respiratoire chronique chez les poulets et de sinusite chez la dinde.

Mycoplasma gallisepticum représente un problème important pour les poulets de chair, les poules pondeuses et les reproducteurs : diminution de l'alimentation des animaux, baisse de 10 à 20% de l'indice de consommation, baisse de 20 à 30% du gain de poids. Chez les pondeuses, la ponte diminue de 10 à 20 % et on retrouve 5 à 10 % de mortalité embryonnaire.

De plus, les lésions provoquées par la maladie induisent des pertes économiques à l'abattage suite au déclassement des carcasses. On peut rajouter à ces pertes le coût du traitement.

Toutes ces conséquences font de *M. gallisepticum* le facteur d'une des pathologies les plus coûteuses pour la filière aviaire.

3.2. Etiologie :

Contrairement à l'agalactie contagieuse, un seul mycoplasme est ici à l'origine de la pathologie : *Mycoplasma gallisepticum*. C'est une bactérie d'environ 0,25 à 0,5 µm, elle possède un filament qui semble avoir un rôle dans la mobilité mais aussi dans les interactions avec l'hôte et la pathogénicité. Les conditions de culture sont identiques aux autres mycoplasmes : milieu enrichi avec du sérum de cheval, de porc ou d'oiseau.

La plupart des désinfectants habituels sont efficaces contre *M. gallisepticum*.

M. gallisepticum est peu résistant dans le milieu extérieur : il reste viable 1-3 jours à 20°C dans des fientes de poulets, 3 jours à 20°C sur des habits en mousseline, 6 semaines à 20°C dans du jaune d'œuf.

Ce mycoplasme possède aussi une hypervariabilité des protéines de surface qui pourrait être responsable de l'échappement aux réponses immunitaires de l'hôte.

3.3. Les animaux atteints :

Les animaux infectés naturellement sont : le poulet, la dinde, le faisan, la perdrix chouka, le paon, la caille japonaise pour les plus courants. *M. gallisepticum* a été isolé chez le canard en Angleterre et en Yougoslavie, et chez l'oie en France et en Yougoslavie.

3.4. Le tableau clinique :

3.4.1. Chez le poulet :

Les signes les plus caractéristiques chez les adultes sont les râles trachéaux, le jetage et la toux. Le niveau d'alimentation baisse ainsi que le poids des animaux. Chez les pondeuses, la ponte chute mais persiste à un faible niveau. Par contre, certains lots peuvent présenter une sérologie positive tout en ne montrant aucun signe clinique de l'affection ; en général, ces lots ont été en contact avec le mycoplasme alors qu'ils étaient jeunes.

Les mâles sont en général plus touchés que les femelles et la clinique est plus prononcée lors des mois d'hiver.

Chez les poulets de chair, la clinique apparaît surtout entre 4 et 8 semaines d'âge. Les signes sont plus prononcés chez les adultes et les troubles sévères sont dus à des complications.

Des kératoconjunctivites ayant pour origine *M. gallisepticum* ont été rapportées au Japon chez des poulets de 30 jours : augmentation du volume de la face et des orbites, congestion des vaisseaux conjonctivaux et râles respiratoires.

Généralement, tous les poulets d'un lot sont atteints avec une variabilité au niveau de la gravité et de la durée ; de plus, les affections sont plus longues et plus sévères pendant les mois d'hiver et les adultes sont moins atteints que les jeunes. La mortalité est souvent négligeable dans des lots d'adultes en été mais peut atteindre 30% chez les poules pondeuses en hiver.

M. gallisepticum est un agent primaire mais d'autres pathogènes peuvent venir compliquer le tableau clinique : *E. coli*, la maladie de Newcastle, les virus de la Bronchite Infectieuse...

3.4.2. Chez la dinde :

Le mycoplasme est responsable d'une sinusite : augmentation de volume des sinus paranasaux, jetage, yeux mi-clos ou clos et la prise alimentaire pouvant être nulle si les animaux n'y voient plus. Il peut y avoir aussi une atteinte plus profonde de l'appareil respiratoire avec une aérosacculite et une trachéite : râles, toux. Il existe aussi une forme cérébrale chez les dindes de chair de 12 à 16 semaines d'âge avec des torticolis et des opisthotonos. Chez les pondeuses, la ponte peut chuter.

Beaucoup de dindes dans un même lot sont malades même si certaines ne présentent qu'une forme respiratoire bénigne. Sans traitement, la pathologie peut persister plusieurs mois. La morbidité et la mortalité sont très variables ; en général, cela commence entre 8 et 15 semaines d'âge avec des petits problèmes respiratoires ; puis, en 2 à 7 jours, une toux sévère s'installe chez 80 à 90 % des animaux, ainsi qu'une augmentation du volume des sinus et du jetage pour 1 à 70% du lot.

3.5. La transmission :

La contamination directe domine mais la contamination indirecte est possible : mycoplasmes transportés par le vent, par les gouttelettes de pluie... La contamination par des équipements est fortement suspectée mais pas encore documentée. Les œufs peuvent être contaminés car ces mycoplasmes sont retrouvés dans le tractus génital des femelles et dans la semence des reproducteurs.

La contamination directe latérale est décrite en quatre phases :

- Phase latente pendant 12-21 jours où aucun anticorps n'apparaît ;
- Phase deux pendant 1-21 jours où 5 à 10 % des animaux sont atteints ;
- Phase trois pendant 7-32 jours où 90 à 95 % des animaux sont malades ;
- Phase quatre pendant 3-19 jours où le lot en totalité est touché.

2^{ème} PARTIE : EXPERIMENTATION ANIMALE

1. Principes et objectifs :

Cette expérimentation fait suite à plusieurs autres travaux menés au sein du service de reproduction de l'ENVT au cours des années précédentes : en 1998 (F. DUQUESNOY), en 1999 (M. NURIT). Lors de ces études, les objectifs étaient d'évaluer l'effet biologique *in vivo* des surnageants de culture de *M. agalactiae*, soit issus d'une population totale et hétérogène, soit de variants clonaux. En effet, deux types d'arguments étaient à l'origine de ces expérimentations :

- chez *M. agalactiae*, au moins deux protéines de la famille Vpma, hypervariables et immunogènes, étaient retrouvées abondamment dans les surnageants de cultures ; la question de leur rôle après sécrétion ou libération était posée.
- chez les mycoplasmes en général, les connaissances actuelles concernant les déterminants moléculaires du pouvoir pathogène ne permettent pas de décrire de véritables toxines *stricto sensu* ; au contraire, la pathogénie semble reliée à la libération par les mycoplasmes de divers catabolites : H₂O₂, radicaux superoxydes, enzymes,...ainsi qu'à l'intervention de (lipo)protéines interagissant avec le système immunitaire.

C'est pourquoi des expérimentations d'inoculation intra-mammaire de surnageants de culture dépourvus de mycoplasmes ont été conduites. Ces travaux ont été fructueux puisque à chaque fois, une hypogalactie ou une agalactie était notée sur les demi-mamelles inoculées, accompagnée d'une forte inflammation contrairement aux témoins.

Afin de poursuivre dans cette voie, il a été décidé de réaliser une expérimentation visant à connaître la **spécificité** de l'effet du surnageant de *Mycoplasma agalactiae* sur la production laitière des brebis. En effet, les résultats obtenus lors des précédentes inoculations pouvaient être dus à un effet de composants non spécifiques de *M. agalactiae*, libérés ou sécrétés par d'autres mycoplasmes, ou même à un artefact (effet inflammatoire ou immunitaire de débris membranaires ou cytoplasmiques de mycoplasmes morts,...).

Pour ce faire, nous avons choisi de reprendre le même principe que les deux séries de travaux précédents, c'est-à-dire des inoculations intra-mammaire de surnageants de culture de mycoplasmes, mais en testant également un autre mycoplasme : *Mycoplasma agalactiae* bien sûr et *Mycoplasma gallisepticum*, pathogène chez les volailles. Ce dernier a été choisi car il n'est pas isolé de mamelle de ruminants, mais au contraire principalement de l'appareil respiratoire de volailles. Cette stratégie pouvait conduire à mettre en évidence un effet spécifique de composants de *M. agalactiae*, mycoplasme présentant *a contrario*, un fort tropisme pour la mamelle (ou en tout cas un effet non partagé par tous les mycoplasmes).

A la vue des résultats des travaux précédents, le lot inoculé par le surnageant de culture de *Mycoplasma agalactiae* est considéré comme étant une référence et représente le lot témoin positif, révélateur du déroulement habituel de l'effet agalactogène.

2. Matériel et méthode :

2.1. Matériel d'étude : les animaux

2.1.1. Origine et devenir des animaux :

Les animaux ayant servis à l'expérimentation sont des brebis de race tarasconnaise provenant de l'Union des Agriculteurs du Comminges située en Haute-Garonne, région qui est cliniquement indemne d'agalactie contagieuse. Cependant les brebis ont été testées avant la sélection pour l'expérimentation. Toutes les brebis devaient être gravides et en fin de gestation, condition sine qua non de réception de ces animaux. Ces animaux sont arrivés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) au début du mois d'octobre afin que les étudiants de l'ENVT réalisent des opérations de césarienne peu avant le terme. L'effectif comportait une quinzaine de brebis avant la réalisation des césariennes.

Ces brebis ont alors été réparties en trois groupes pour correspondre aux trois séances de césarienne : le 14/10 (lot C1), le 28/10 (lot C2) et le 9/11 (lot C3) ; chaque lot se trouvait dans un box distinct. A la fin des séances, il restait 12 brebis. Chacune était la mère d'un agneau, sauf deux qui avaient des jumeaux (la brebis 5216 dans le lot C1 et la brebis 6901 dans le lot C2) et sauf une brebis qui avait perdu son agneau et adopté l'agneau d'une brebis morte (la brebis 1368 et l'agneau 3804). Seules trois brebis avaient mis bas naturellement : les brebis 6827 et 6901 ayant mis bas le 30/10 et la brebis 5205 ayant mis bas le 7/11. Toutes les mères étaient nourries avec du foin de luzerne à volonté et avec 400 grammes de concentrés de production par jour; cependant 5 jours avant l'inoculation, suite à la rupture du stock de foin de luzerne, la ration a changé : foin de pré plus pour chacune 400 grammes de bouchons de luzerne et 400 grammes de concentrés de production par jour.

2.1.2. Critères de sélection des brebis :

Afin d'éliminer de l'expérimentation les brebis présentant des caractéristiques incompatibles avec nos objectifs (risque de biais), nous les avons sélectionnées suivant plusieurs critères :

a) Examen clinique des animaux : état général (prise de température, notation de l'état d'entretien), vérification de la plaie de césarienne et soins s'il y a lieu, examen des yeux et des articulations (localisations privilégiées par les mycoplasmes) et examen attentif des mamelles (inspection, palpation : recherche de nodules, d'indurations, d'abcès,..., état des nœuds lymphatiques).

Cet examen clinique n'a pas écarté de brebis mais, suite à celui-ci, des traitements ont été effectués sur certaines brebis.

Ces traitements étaient :

Traitement d'une kérato-conjonctivite de 4978 avec de l'OphtalonND du 23/11 au 10/12 ;

Pulvérisation sur les mamelles de VétanelND suite à de l'impétigo ou de l'ecthyma sur plusieurs brebis : 4903, 4978, 6901, 6827, 5419. Le traitement a été arrêté plusieurs jours avant l'inoculation afin de ne pas biaiser la manipulation.

Reprise des sutures de césariennes sur deux brebis : 1369 et 5419.

Antibiothérapie avec du CobactanND (béta-lactamine afin de ne pas cibler les mycoplasmes) pour diverses raisons : impétigo, métrite, jetage, pus au niveau de la plaie de la césarienne. Les brebis traitées étaient : 6901,4978,5205,2945,3272,1368,4911,5419. Le traitement s'est arrêté au plus tard la veille de l'inoculation.

Par ailleurs, les brebis ont fait l'objet d'une vermifugation: le 10/11 avec 10 ml d'OramecND;

b) Mesure des productions de lait par traite manuelle : le 17/11/00 pour C2 et pour les trois lots les 22/11, 24/11, 29/11 (la description de la réalisation des prélèvements est décrite au paragraphe 2.3.2.3.).

Le tableau suivant montre les productions laitières de chaque brebis au sein des trois lots :

Tableau 5 :La production laitière de chaque demi-mamelle des brebis des trois lots en ml (G=gauche et D=droite).

Brebis	Côté	Production le 22/11	Production le 24/11	Production le 29/11
3272	G	410	360	390
3272	D	260	240	255
4903	G	240	230	255
4903	D	285	260	310
4978	G	260	230	255
4978	D	300	290	300
5216	G	250	220	280
5216	D	260	220	255
4911	G	150	130	150
4911	D	150	190	185
6827	G	200	120	160
6827	D	200	190	170
4743	G	190	225	225
4743	D	220	235	275
2945	G	95	115	160
2945	D	100	135	170
5205	G	40	40	-
5205	D	540	520	575

Ces productions sont constantes, régulières et symétriques, à part une brebis qui a perdu une demi-mamelle : la 5205.

c) Sérologie mycoplasme : recherche d'anticorps anti *Mycoplasma agalactiae* : prise de sang sur toutes les brebis le 23/11 et envoi à l'EPLD 64. Toutes les sérologies furent négatives.

d) Bactériologie classique du lait les 17/11 et 1/12 sur les trois lots : les analyses ont été effectuées au laboratoire de reproduction de l'ENVT. Trois brebis furent écartées de l'expérimentation suite à cette bactériologie : les numéros 6994, 3808 et 6901.

e) Bactériologie mycoplasmaïque du lait par PCR après enrichissement en bouillon DE à l'ENVY : toutes étaient négatives.

f) Stade de lactation, car toutes les brebis n'ont pas mis bas ou subi de césarienne à la même date.

g) Comptage cellulaire individuel sur le lait : trois analyses ont été réalisées sur les trois lots les 17/11, 22/11, 24/11. Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant.

Tableau 6 : Les comptages cellulaires somatiques des demi-mamelles des brebis (G=gauche et D=droite).

Brebis	Côté	Résultats du 17/11 (cellules/ml)	Résultats du 22/11 (cellules/ml)	Résultats du 24/11 (cellules/ml)
5216	D	182 000	100 000	87 000
5216	G	318 000	106 000	86 000
4978	D	82 000	67 000	53 000
4978	G	84 000	80 000	67 000
4911	D	68 000	78 000	86 000
4911	G	137 000	76 000	90 000
4743	D		73 000	86 000
4743	G		68 000	71 000
4903	D	88 000	838 000	84 000
4903	G	61 000	88 000	93 000
6827	D	772 000	54 000	83 000
6827	G	56 000	49 000	64 000
2945	D		89 000	75 000
2945	G		211 000	54 000
3272	D		21 641 000	1 409 000
3272	G		69 000	118 000
5205	D		269 000	1 172 000

Certains résultats sont absents : le laboratoire n'a pu analyser ces prélèvements car la proportion de conservateur utilisé dans les pots étaient trop importante par rapport à la quantité de lait (hypogalactie ou laits modifiés).

Cependant, à la vue de ces résultats, la grande majorité des brebis a des CCS (Comptages Cellulaires Somatiques) corrects (< 100 000 cellules somatiques par ml) ; cinq brebis ont eu des CCS > 100 000 cellules/ml (les 5216, 4911, 4903, 6827, 2645) mais lors du dernier prélèvement, leurs valeurs sont devenues acceptables ; la brebis 3272 a des valeurs élevées le 22/11 (la demi-mamelle droite a plus de 21 millions de cellules), mais le 24/11 ces valeurs ont diminué, même si elles sont encore élevées ; enfin la brebis 5205 a un CCS qui augmente (plus d'un million le 29/11).

2.1.3. Réalisation des trois lots de l'expérimentation :

Il reste donc 9 brebis à répartir dans trois groupes : le lot témoin positif (surnageant de *M. agalactiae*), le lot témoin négatif (surnageant de milieu de culture nonensemencé) et le lot testé (surnageant de *M. gallisepticum*).

Répartition du nombre de brebis par lot : il faut le maximum de brebis dans le lot testé : quatre brebis plus la brebis qui a une demi-mamelle tarie ont été placées dans ce lot. Pour le lot témoin positif, à la vue de la variabilité individuelle observée lors des précédentes manipulations, il faut le plus grand nombre possible d'animaux dans ce lot : il a été décidé d'y mettre trois brebis et de ne mettre qu'une brebis dans le lot témoin milieu en prenant garde de bien la choisir (la plus parfaite possible : production forte et équilibrée des deux côtés, pas de problème bactériologique ou de CCS dans le lait). Il avait en effet été démontré à plusieurs reprises que l'effet de l'inoculation d'un surnageant de culture nonensemencé était nul.

Répartition de chaque brebis dans les lots :

- la brebis la plus parfaite possible a été placée dans le lot témoin négatif.
- dans chacun des deux lots, une des brebis qui répondent le plus parfaitement aux critères définis (forte production, production équilibrée des deux côtés, pas de problème bactériologique ni de comptage cellulaire individuel élevé dans le lait) a été placée.
- on complète les deux lots en y mettant des brebis de façon à ce qu'il y ait des brebis de tous les stades de lactation dans chaque lot et de façon à ce que la production moyenne d'un lot soit voisine de la production moyenne de l'autre lot.
- une brebis avec une seule demi mamelle en lactation a été admise dans le lot testé .

En ce qui concerne le choix du côté à inoculer : on prend à chaque fois le côté qui produit le plus afin que l'effet agalactogène soit le plus marqué possible.

La composition définitive des lots fut la suivante :

Tableau 7 : composition des trois lots : il y figure les brebis choisies ainsi que les côtés à inoculer (G=gauche et D= droite) :

Lot témoin négatif	Lot témoin positif	Lot testé
5216 G	4978 D 4911 D 4743 D	4903 D 6827 D 2945 D 3272 G 5205 D

Dès la réalisation des trois lots, les animaux ont été regroupés puis mis dans deux boxes : dans le premier se trouvait le lot témoin négatif et dans le second le lot témoin positif et le lot testé. Les agneaux ne quittent pas leur mère respective.

2.2. Matériel d'étude : les deux inoculums

2.2.1. Les cultures « starters » :

Les deux inoculums sont préparés à partir de cultures « starters ». Ces cultures sont lancées le 29/11/01 à 17h00 au service de pathologie de la reproduction de l'ENVT. Les cultures des deux mycoplasmes proviennent de fractions aliquotes congelés à -80°C sous 150 μl . Ces aliquotes sont remis en suspension dans le milieu complet DE (Difco enrichi) du 18/01/00 dans des tubes Falcon ; auparavant, des ensemencements ont été réalisés à partir de ce milieu sur des géloses au sang : le milieu est stérile. Ces cultures sont mises à l'étuve en atmosphère enrichie en CO_2 .

2.2.2. Le repiquage des cultures en grands volumes :

Le 1/12/00, après observation des tubes, les cultures apparaissent troubles pour les deux mycoplasmes, donc positives. Du milieu DE complet est ensuite utilisé pour obtenir les volumes nécessaires pour la suite de la manipulation. Ces volumes sont détaillés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Réalisation des volumes des trois cultures :

	Volume nécessaire pour l'inoculation	Volume nécessaire pour le dénombrement	Volume nécessaire pour le stockage	Volume total nécessaire
Lot témoin négatif	20 ml	5 ml	10 ml	35 ml
Lot témoin positif	30 ml	5 ml	10 ml	45 ml
Lot testé	50 ml	5 ml	10 ml	65 ml

Les trois préparations sont mises à l'étuve sous milieu enrichi en CO_2 .

2.2.3. Reprise des préparations et réalisation des inoculums :

Le 4/12/00, donc après trois jours de culture, les cultures des deux mycoplasmes semblent avoir bien poussées car leur aspect est trouble et un culot est présent. Le même jour, les trois préparations sont centrifugées plusieurs fois : première centrifugation à 8000g pendant 20 minutes à 4°C , puis les deux suivantes à 18514g (le maximum possible) pendant 25 minutes à 4°C . La centrifugeuse utilisée est de la marque EPPENDORF ; dès qu'une centrifugation est terminée, le surnageant est pipeté avec précaution afin de ne pas remettre en suspension le culot.

Une fois ces trois centrifugations terminées, les trois préparations sont filtrées à trois reprises : la première filtration a été réalisée à l'aide des unités de filtration MILLIPORE-STERICOP-0,22 µm GP Express membrane 150 ml (Neck size 45mm) ; les deux filtrations suivantes ont utilisé des filtres unitaires de 0,1 µm (Millex W 0,1 µm-Filter unit ; ref : 84649 ; MILLIPORE). Le substrat a été conduit à travers les différents filtres à l'aide de la pression exercée par une seringue.

Les filtrations terminées, les inoculums étaient prêts.

2.2.4. Protocole de dénombrement des cultures en grands volumes :

Le 5/12/00, ont été réalisés des ensemencements de 12 dilutions décimales en plaque ELISA des cultures en grands volumes. Le 11/12/00, des pousses sont observées et confirmées par des PCR Mollicutes sur les dernières dilutions positives. La technique de dénombrement de Mc Grady a été ainsi utilisée pour ces dénombrements ; elle a permis d'établir les titres suivants :

- lot témoin positif (*M. agalactiae*) : $1,75 \cdot 10^{10}$ UFC/ml.
- lot testé (*M. gallisepticum*) : $0,25 \cdot 10^{10}$ UFC/ml

2.2.5. Vérification de la stérilité des inoculums :

Le 4/12/00, des inoculums sont ensemencés dans du milieu DE puis mis à l'étuve jusqu'au 11/12/00 dans du milieu enrichi en CO₂. De même, des inoculums tels quels sont déposés dans des tubes Falcons puis mis dans les mêmes circonstances dans l'étuve. Le 11/12/00, une gélose au sang est réalisée pour chacun des inoculums. Les résultats sont les suivants : les inoculums de *M. gallisepticum* et de *M. agalactiae* sont stériles.

2.3. Les méthodes de travail :

2.3.1. L'inoculation :

L'inoculation a eu lieu le 4/12/00 au soir. Les femelles ont été examinées une dernière fois, puis leur mamelle fut vidée par une traite manuelle. Les animaux étaient alors mis en position assise, les trayons désinfectés avec une compresse imbibée d'alcool à 70°. L'inoculum constitué par 7 ml de la solution était alors injecté dans la mamelle par le trayon via l'extrémité d'une pipette en plastique. Une fois l'inoculum injecté dans la citerne, la mamelle est massée pour permettre une diffusion maximale du surnageant au sein de la glande mammaire.

2.3.2. Les paramètres mesurés :

A partir du jour de l'inoculation, différents paramètres ont été suivis afin d'évaluer les conséquences de la présence de surnageant des différentes bactéries dans la glande mammaire.

2.3.2.1. Examen clinique :

Avant toute chose, le matin, un examen clinique de l'animal était réalisé : température rectale, examen des glandes mammaires (recherche d'un déséquilibre de la glande, d'impétigo, d'ecthyma, de blessures provoquées par les agneaux,...). A la fin de la traite, étaient réalisées et notées selon une graduation une palpation de la glande mammaire afin de détecter toute modification de la densité du parenchyme mammaire et la présence de « nodules » (induration, abcès) ainsi qu'une palpation des nœuds lymphatiques rétro-mammaires.

2.3.2.2. Prélèvements :

Lors des séances des prélèvements eurent lieu :

- Un prélèvement des premiers 60 ml de lait à chaque séance pour un examen macroscopique du lait puis pour un comptage cellulaire somatique.
- Un prélèvement pour une bactériologie : après l'éjection des premiers jets de lait, l'extrémité du trayon était nettoyé à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool à 70°, le lait était ensuite dirigé directement dans un tube stérile tout de suite fermé à la fin de la manipulation.
- Un prélèvement sérologique.

2.3.2.3. Production laitière :

Le paramètre le plus important est la mesure de la production laitière des animaux : en appelant J0 le jour de l'inoculation, des prélèvements ont été réalisés à J1, J2, J3, J4, J7, J10 et J15.

La production était mesurée grâce à une traite manuelle des animaux. La veille au soir, toujours vers la même heure, soit 19h15, une vidange manuelle des mamelles était réalisée afin de parfaire la tétée des agneaux et éviter tout biais, de plus les agneaux étaient mis dans un autre box jusqu'au lendemain; deux boxes étaient prévus à cet usage afin de ne pas mélanger des agneaux de boxes différents. La mesure avait lieu le matin, vers 9h15. Toutes les brebis d'un même box étaient traites puis remises dans leur box d'origine. Leur agneau leur était ensuite rendu.

Chaque demi-mamelle était traitée à la main par le même opérateur et la production notée.

2.3.2.4. Les techniques d'analyses utilisées :

Sur les prélèvements de lait :

La bactériologie classique :

Une fois récolté et après homogénéisation, le lait est rapidement ensemencé sur une gélose au sang.

Les boîtes de pétri sont ensuite mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Si, au bout de ce laps de temps, aucune colonie n'est apparue, les géloses sont mises en incubation en atmosphère enrichie en CO₂. Si aucune colonie n'était encore visible, l'incubation était prolongée pendant cinq jours.

Par contre, si dès les premières vingt quatre heures, des pousses étaient visibles, les colonies étaient isolées puis repiquées et incubées pendant 24 heures à 37°C avant d'être soumises à une coloration de Gram.

Les coques Gram+, les coccobacilles Gram+ et les bacilles Gram+ subissaient un test à la catalase et à la coagulase afin de distinguer les staphylocoques des streptocoques. Les bacilles Gram- étaient soumis au test de l'oxydase.

La bactériologie mycoplasmaïque :

Du lait prélevé, nous prenions 0,2 ml que nous mélangions à 1,8 ml de bouillon DE pour mycoplasme. Une seconde dilution dans les mêmes proportions était ensuite réalisée avant une mise à l'étuve sous atmosphère enrichie en dioxyde de carbone, à 37°C pendant trois jours. Nous réalisions ensuite deux repiquages à trois jours d'intervalle.

Les mycoplasmes sont identifiés grâce à des antisérums de lapins polyclonaux hyperimmuns spécifiques à l'aide d'une technique ELISA.

Le comptage cellulaire somatique :

Les récipients de 60 ml, une fois remplis, étaient déposés au réfrigérateur jusqu'au soir. A ce moment, nous observions macroscopiquement l'aspect du lait : consistance, densité, présence de grumeaux.

Ces récipients étaient ensuite envoyés au Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières du Sud-Ouest : Cial S-O à Auch. La technique utilisée est la méthode opto-fluoro-électronique. Elle nécessite une quantité minimale de lait qui n'a pas toujours été obtenue, compte tenu de l'état d'hypogalactie de certaines brebis. De plus, certains laits de consistance très modifiée ont entraîné des problèmes de colmatage du système empêchant toute possibilité de lecture. Au total, ces résultats ne peuvent être présentés.

Sur les prélèvements de sang :

La sérologie :

Une fois prélevé le matin sur tube sec, le sang était centrifugé en fin d'après-midi à 2500 tours par minute pendant un quart d'heure. Le sérum était alors prélevé dans deux aliquotes : un pour l'analyse et un gardé comme archive. Les aliquotes ont été gardés au congélateur jusqu'à la fin de l'expérimentation pour être envoyés au laboratoire et être testées en ELISA. Ce volet ne fait pas parti de ce travail de thèse.

3. RESULTATS

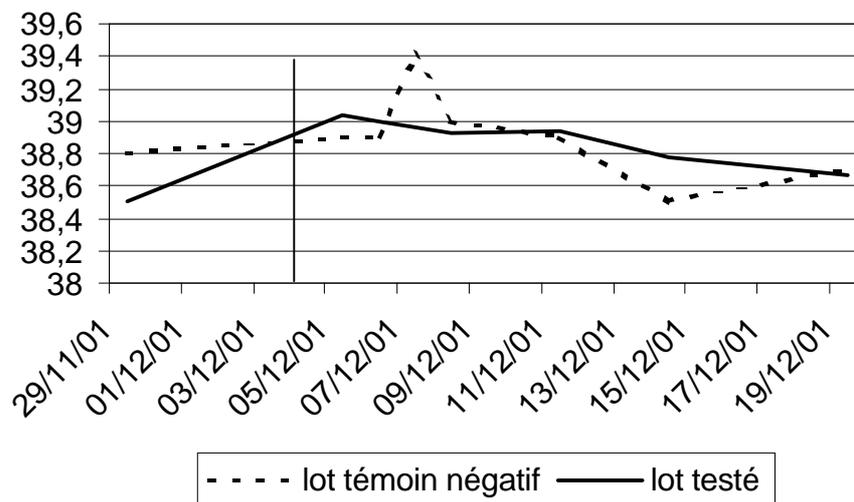
3.1. Présentation des résultats :

Les données ont été traitées grâce au logiciel EXCEL 97 de Microsoft.

En ce qui concerne la production laitière, les résultats sont présentés sous forme de ratio : le numérateur est la production de la demi-mamelle inoculée et le dénominateur est la production de la demi-mamelle non inoculée. Etant donné que nous avons pris, sauf pour la brebis n'ayant qu'une demi-mamelle en lactation, comme demi-mamelle à inoculer celle qui produisait le plus, les ratios de début d'expérimentation étaient tous supérieurs à un.

3.2. L'évolution des températures rectales :

Les tableaux suivants montrent l'évolution des températures rectales des brebis, l'inoculation ayant eu lieu le 4/12 au soir.



Graph 1 : évolution des températures rectales des brebis des lots milieu et *M. gallisepticum*.

En ce qui concerne le lot témoin positif, aucune variation de la température n'a été notée tout au long de l'expérimentation.

Les températures rectales restent dans des intervalles de valeurs comprises entre 38,5°C et 39,5°C.

3.3. Les examens cliniques :

Aucune des brebis n'a présenté de signe clinique ayant une autre localisation que la glande mammaire : pas d'arthrite, pas de kératoconjonctivite, pas de problème respiratoire ou autre. Les brebis ont gardé leur appétit et aucun signe montrant une baisse de l'état général (pas de rumination, apathie) n'a été observé.

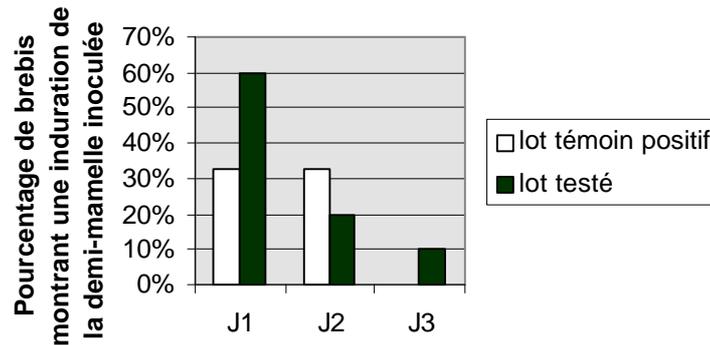
En ce qui concerne les nœuds lymphatiques, le tableau suivant présente les résultats obtenus :

Tableau 9 : résultats des palpations des nœuds lymphatiques rétro-mammaires des brebis : l'intensité de la réaction du nœud lymphatique est représentée par le nombre de croix.

	J1	J2	J3	J4
Lot témoin négatif				
5216G	+	+	-	+
5216D	-	-	-	-
Lot témoin positif				
4978G	-	-	-	-
4978D	-	+	+	-
4911G	+	++	+	+
4911D	-	+	+	-
4743G	+	-	-	-
4743D	+	+	++	+
Lot testé				
4903G	+	+	-	-
4903D	+	+	+	+
6827G	+	+	+	+
6827D	++	+++	+++	++
2945G	+	+	+++	+
2945D	++	++	+++	+
3272G	++++	+++	+++	+++
3272D	+	++	+++	+
5202G	-	-	-	-
5205D	+	+	+	+

Toutes les demi-mamelles inoculées et non inoculées - sauf pour le témoin négatif pour lequel seule la demi-mamelle inoculée est concernée - montrent des réactions d'intensité variables au niveau des nœuds lymphatiques, et ce quasiment jusqu'à J4. Après J4, pour toutes les brebis, la réaction des nœuds lymphatique décroît.

Des indurations de la mamelle ont été notées après inoculation et aucune avant :



Graphe 2 : Evolution dans le temps des indurations notées sur les demi-mamelles inoculées.

Pour ces indurations, nous avons distingué chaque demi-mamelle : seules les demi-mamelles ayant fait l'objet d'une inoculation ont montré des indurations. Le lot témoin négatif n'a présenté aucune induration. Après J3, plus aucune demi-mamelle n'est indurée.

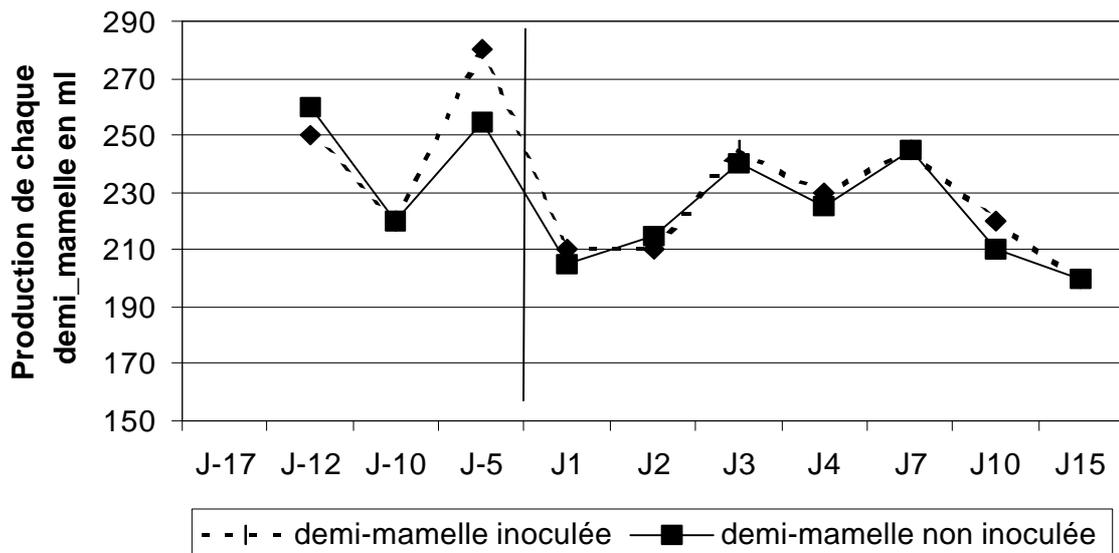
En ce qui concerne les déséquilibres entre les deux demi-mamelles, tous les déséquilibres observés après l'inoculation ont affecté toutes les demi-mamelles inoculées, qui sont devenues plus petites que les autres demi-mamelles ; et ce jusqu'à J4, au-delà, les tous les déséquilibres ont disparu.

3.4. La production laitière :

3.4.1. Courbe des moyennes de production :

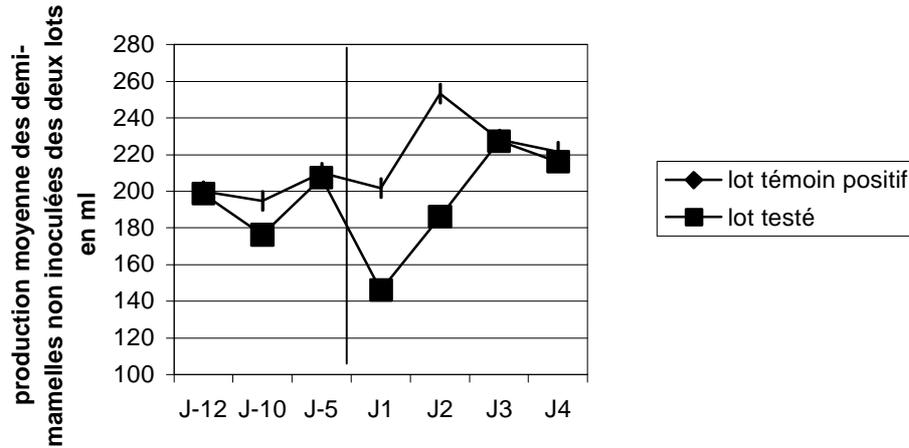
Toutes les moyennes calculées ici sont des moyennes arithmétiques.

- Lot témoin négatif :

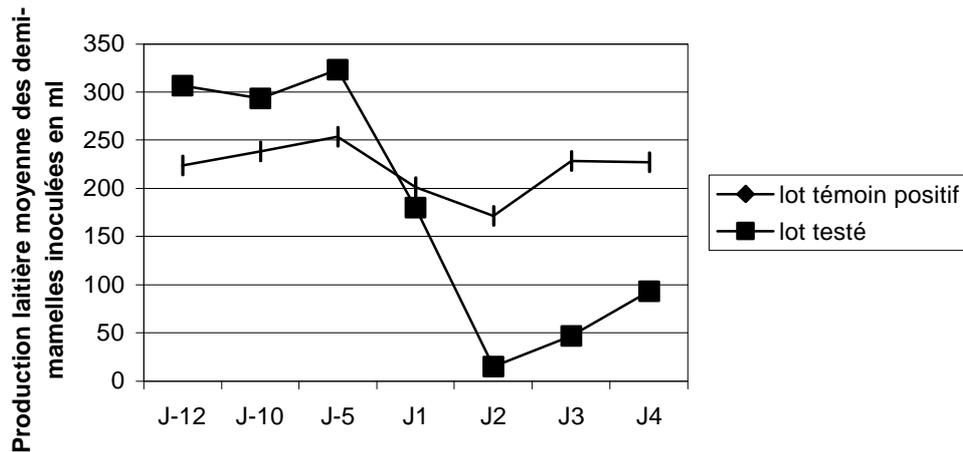


Graphe 3 : production au cours du temps des deux demi-mamelles de la brebis témoin milieu.

- Autres lots :



Graphe 4 : production moyenne au cours du temps des demi-mamelles non inoculées des deux lots.



Graphe 5 : Production moyenne au cours du temps des demi-mamelles inoculées des deux lots.

Les courbes de production s'arrêtent à J4 car, les jours suivants, la production reste constante pour tous sauf pour les demi-mamelles inoculées du lot testé qui retrouvent une production normale (vers 200 ml en moyenne) à J7.

3.4.2. Courbe des ratios :

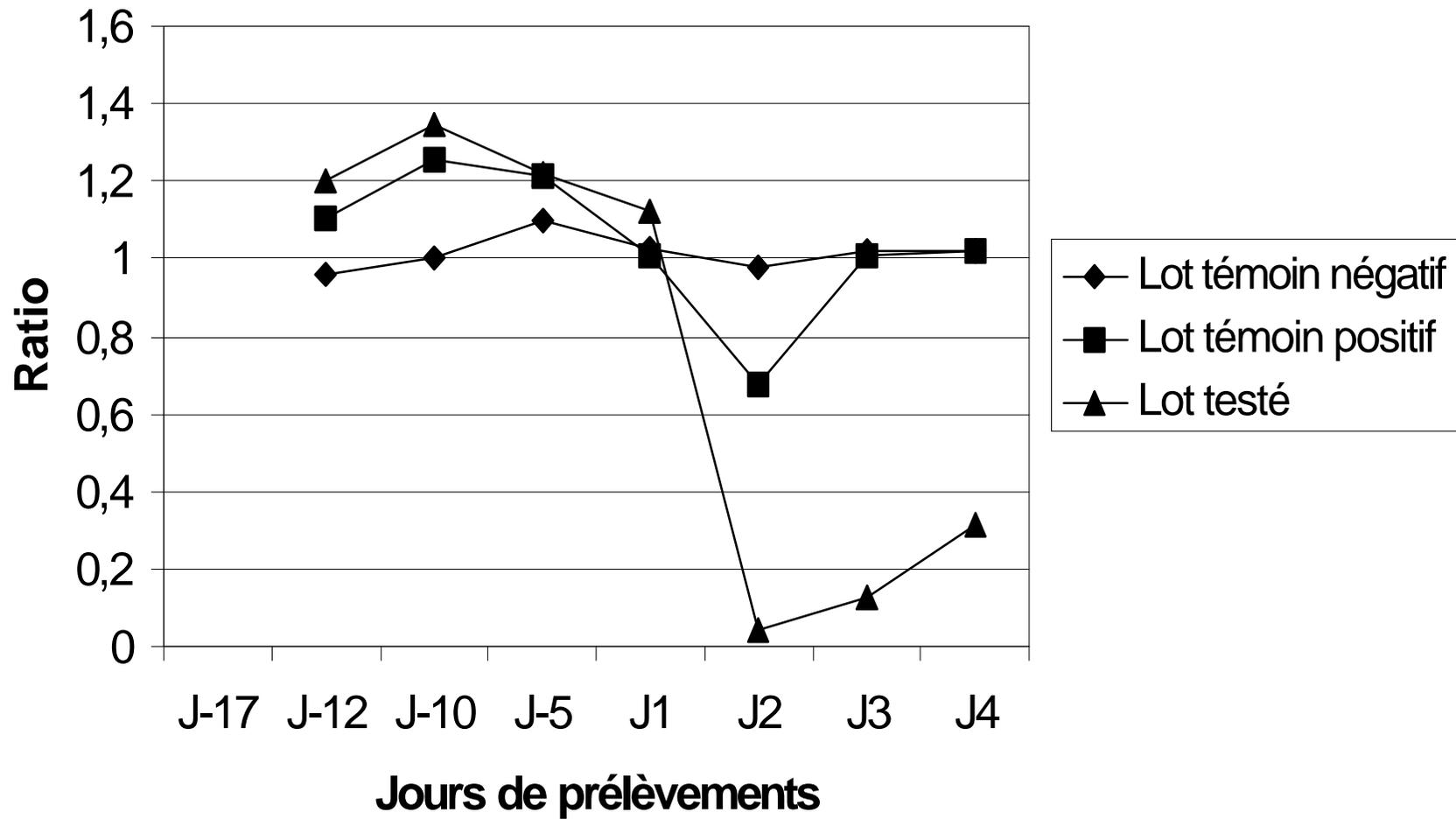
Les ratios de production étaient calculés pour chaque animal. Le ratio moyen de chaque lot était alors calculé.

Nous avons ainsi obtenu trois courbes des ratios moyens pour les trois lots.

Le lot témoin négatif, comprenant une brebis, présente une courbe qui reste très proche de la valeur 1 tout au long de l'expérimentation.

Le lot témoin positif, c'est-à-dire celui inoculé avec du surnageant de culture de *Mycoplasma agalactiae*, a une courbe qui est restée au-dessus de la valeur 1, allant même au delà de la valeur 1,2 à J-10 et J-5 ; après l'inoculation, le ratio chute dès J1 à 1 puis à 0,7 à J2, le ratio remonte ensuite pour rester vers la valeur 1 dès J3 et s'y maintenir jusqu'à la fin.

Le lot inoculé avec le surnageant de *Mycoplasma gallisepticum* a une courbe avant inoculation comparable avec celle du témoin positif, les ratios étant supérieurs à 1,2. Après inoculation, à J1, on note une légère diminution du ratio qui reste quand même supérieur à 1,1. Par contre à J2, le ratio a effectué une chute considérable en tombant entre 0 et 0,1. Lors des jours suivants, le ratio va entamer une remontée régulière : un peu plus de 0,2 à J3, entre 0,4 et 0,5 à J4. Ensuite, le ratio revient à des valeurs proches de 1.



Graph 6 : Evolution des ratios côté inoculé sur côté non inoculé pour les trois lots au cours du temps.

3.5. L'aspect du lait :

L'observation de l'aspect du lait comprenait plusieurs critères : la présence/absence de grumeaux et une éventuelle modification de la consistance ou de la couleur du lait.

Le lait du témoin négatif n'a présenté aucune modification tout au long de la manipulation. Au sein du lot témoin positif, une seule brebis (4911) a montré une présence de grumeaux sur les laits des deux demi-mamelles à J2.

Le lot testé a présenté des laits très modifiés : dès J1, quatre brebis sur les cinq avaient un lait provenant des côtés inoculés avec beaucoup de grumeaux et une consistance plus visqueuse, certains laits ressemblaient même à de la crème ; à J2 toutes les brebis étaient atteintes et ce jusqu'à J4 ; à J5 les laits étaient devenus normaux.

4. Discussion :

4.1. Validité du matériel et des méthodes :

4.1.1. Choix du matériel d'étude : les brebis

L'origine des brebis utilisées lors de cette expérimentation constitue déjà un élément favorable vis-à-vis de la contamination éventuelle des animaux par *Mycoplasma agalactiae* et par les autres mycoplasmes, car la région d'origine est cliniquement indemne de ces pathologies. De plus, l'état clinique des animaux était correct et ne laissait supposer aucune infection par un de ces germes

Cependant nous ne nous sommes pas arrêtés là et nous avons tenu à vérifier par plusieurs moyens l'état des brebis vis-à-vis des différents germes utilisés pour la manipulation : sérologie négative et PCR négative pour tous les animaux participant à cette expérimentation (outre les recherches bactériologiques non mycoplasmiques).

Le matériel d'étude a donc été testé et ne présente pas de risque quant à un éventuel biais pour la suite de la manipulation. Seule la variabilité interindividuelle des brebis amène un biais probable que nous ne maîtrisons pas.

4.1.2. Choix des effectifs :

Le nombre total de brebis étant fixé par des raisons financières et pratiques, nous n'avons pas pu influer sur celui-ci. Ce nombre, 12 avant la sélection, peut paraître faible vis-à-vis des effectifs utilisés par certains auteurs, mais se situe dans la moyenne de la littérature; cependant, au regard des expérimentations ayant eu lieu à l'ENVT ces dernières années sur le même sujet, les effectifs sont voisins :

Tableau 10 : effectif des lots lors des expérimentations précédentes à l'ENVT.

	Nombre de lots	Effectif par lot
Expérimentation en 1997(J. ROILETTE)	3	4, 5 et 7
Expérimentation en 1998 (F.DUQUESNOY)	2	5 et 6
Expérimentation en 2000	3	3,5 et 1

Les effectifs sont donc voisins et les manipulations précédentes ayant permis en général de conclure, les effectifs choisis pour la nôtre semblaient corrects.

Cependant le lot témoin milieu ne comporte qu'une seule brebis : c'est effectivement trop peu et très risqué car ces résultats sont une condition sine qua non de la validation de la manipulation ; la nécessité de former deux autres lots avec des effectifs conséquents nous a obligé à ce choix. Pour ce lot nous avons pris la meilleure brebis quant aux résultats bactériologiques, aux comptages cellulaires somatiques du lait et à la production laitière équilibrée entre les deux demi mamelles.

Pour le lot témoin positif, vue la variabilité individuelle importante présente lors des travaux menés les années précédentes, il fallait un effectif correct : trois brebis ont été choisies et cela semblait suffisant.

En ce qui concerne le dernier lot, l'effectif est identique à ceux des expérimentations des autres années.

4.1.3. Choix de la voie d'inoculation :

Pour rester dans la continuité des travaux précédents (ROILETTE,1998 et NURIT,1999), il fallait que la voie d'inoculation de la bactérie soit la même, c'est-à-dire intra-mammaire. L'utilisation de cette voie se justifie par plusieurs éléments : la mamelle est la cible majeure de *M. agalactiae* et la mesure de la production laitière permet d'obtenir facilement une mesure répétable et quantitative. Cette technique d'inoculation avait déjà été utilisée avec succès à plusieurs reprises pour des mycoplasmes :

Tableau 11: Quelques références bibliographiques d'inoculations intra-mammaire de mycoplasmes.

AUTEURS	Mycoplasme inoculé
BALL <i>et al.</i> , 1986	<i>M. canadense</i>
BANGA <i>et al.</i> , 1989	<i>M. mycoides mycoides</i> Large Colony
BOCKLISCH <i>et al.</i> , 1991	<i>M. bovis</i>
REILLY <i>et al.</i> , 1993	<i>M. californicum</i>
HASSO <i>et al.</i> , 1993	<i>M. agalactiae</i>

4.1.4. Choix des cultures de bactéries :

La présence d'un lot inoculé avec du surnageant de culture de *M. agalactiae* était absolument nécessaire. La souche utilisée est la souche PG2 (souche de référence internationale), déjà présente les années précédentes pour les manipulations de 1998 et 1999.

L'autre souche a été choisie afin d'essayer de montrer la spécificité d'action du surnageant de *M. agalactiae* : nous avons pris une souche pathogène chez les volailles : la souche PG 31 (souche de référence internationale) de *M. gallisepticum*. Le choix s'est dirigé vers ce mycoplasme car il est à l'opposé de *M. agalactiae* : il est pathogène chez la volaille et *M. agalactiae* chez les mammifères ; les tropismes tissulaires sont différents (essentiellement la glande mammaire pour *M. agalactiae*, l'appareil respiratoire pour *M. gallisepticum*).

4.1.5. Choix de la conduite du troupeau :

L'alimentation était la même pour toutes les brebis afin d'éviter tout biais de production laitière par un facteur extérieur. Le régime alimentaire a changé peu de temps avant le début de la manipulation (foin de pré à la place de foin de luzerne) mais la suite a montré que ses effets pouvaient être considérés comme négligeables.

Les animaux des différents lots sont logés dans le même bâtiment. Faute de place suffisante, les lots sont regroupés dans deux boxes différents. Ces locaux ont été nettoyés et désinfectés avant l'expérience.

Les agneaux restaient avec leur mère sauf la veille des journées de prélèvements et de mesure, où les agneaux de chaque box étaient mis dans deux boxes distincts pour éviter toute contamination croisée. Les brebis restaient alors seules environ une quinzaine d'heures à chaque fois ; cette méthode a déjà été employée par différents auteurs : BALL et MACKIE, 1984 et 1985; KENNEDY et al., 1987; BOCKLISCH et al., 1991 ; DUQUESNOY, 2000.

4.2. Analyse des résultats :

Nous n'avons pas réalisé de statistiques, puisque la réponse à la question posée (la spécificité) a été nettement obtenue au vu des résultats bruts.

4.2.1. Validité de l'expérimentation :

Pour valider les résultats, il faut tout d'abord s'intéresser aux deux lots témoins :

Lot témoin négatif (milieu) : ce lot composé d'une seule brebis a présenté une production laitière constante et équilibrée entre les deux demi mamelles, une très faible diminution est constatée à J1, mais cela concerne les deux côtés et disparaît dès J2 ; aucun examen clinique n'a permis de détecter une quelconque modification de la glande mammaire que ce soit au niveau du parenchyme, du tégument ou des nœuds lymphatiques ; les examens bactériologiques du lait étaient normaux et identiques à ceux présents avant l'inoculation ; les mises en culture du lait ne montrent aucune trace de mycoplasme. De plus, lors des expérimentations précédentes à l'ENVT, aucun lot inoculé avec le surnageant du milieu de culture n'a présenté d'atteinte de la glande mammaire ou d'un autre organe.

A la vue de l'ensemble des éléments obtenus au cours de la manipulation et des manipulations précédentes, nous pouvons affirmer que l'inoculation intra-mammaire du surnageant du milieu de culture ne provoque aucun symptôme mammaire ni aucun signe d'une quelconque hypogalactie ou agalactie.

Lot témoin positif (*M. agalactiae*) : ce lot comportait trois brebis.

La production laitière de ce lot a montré une nette baisse de production de la demi-mamelle inoculée à J1 et J2 : le ratio atteint 0,7 à J2 ; la production reprend son rythme et sa symétrie dès J3 et J4 ; ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus au cours des travaux de F.Duquesnoy en 1998 qui ont porté sur le même type d'inoculation de *Mycoplasma agalactiae* :

Tableau 12 : comparaison des hypogalacties provoquées par le surnageant de *M. agalactiae* entre trois manipulations réalisées à l'ENVT.

	Année 1998	Année 1999	Année 2000
Début de l'hypogalactie	J1	J1	J1
Fin de l'hypogalactie	J5 (en moyenne)	J4	J3
Ratio moyen minimum obtenu	0,5	0,75 et 0,85	0,7

Dans cette manipulation, comme dans les précédentes, l'hypogalactie observée présente la même cinétique :

- une première chute du ratio à J+12 heures (de 1,1 à 0,7 en 1998 ; de 1,15 à 1 et de 1,1 à 0,9 en 1999 ; de 1,2 à 1 en 2000),
- un pic à J+36 heures (0,5 en 1998 ; 0,75 et 0,85 en 1999 ; 0,7 en 2000),
- ensuite une récupération fonctionnelle qui varie entre J3 en 2000 et J5 en 1998.

Il apparaît que les résultats sont très répétables d'une expérimentation à l'autre ; cela constitue donc un bon modèle et justifie que nous l'ayons choisi comme témoin positif.

Nous pouvons affirmer que les conséquences de l'inoculation sont celles attendues, c'est-à-dire une hypogalactie rapidement exprimée et très vite disparue.

Il en est de même pour les examens cliniques : des indurations du parenchyme mammaire, des nœuds lymphatiques réactionnels, des déséquilibres entre les deux demi mamelles sont observés lors de chaque expérimentation.

Ainsi, les deux lots témoins sont validés et la suite de l'interprétation des résultats peut s'effectuer.

4.2.2. Le lot testé (le lot *Mycoplasma gallisepticum*) :

Ce lot présentait une production laitière symétrique et bien comparable au lot *M. agalactiae* avant l'inoculation. Après l'inoculation, une hypogalactie voire une agalactie pour certaine brebis est apparue dès J1 et surtout J2 ; ensuite la production s'est lentement relancée pour retrouver un équilibre entre les deux quartiers.

Cette très forte chute de production est plus forte que celle provoquée par le surnageant de *M. agalactiae* qui était le seul agent hypogalactogène connu dans cette manipulation.

Les examens cliniques ont révélé, comme avec le lot témoin positif, des modifications de la mamelle signant une atteinte réelle : indurations du parenchyme, demi-mamelle inoculée atrophiée par rapport à la demi-mamelle controlatérale, nœuds lymphatiques réactionnels, lait modifié.

Les mises en culture des inoculums du lot sont négatifs pour la recherche de mycoplasme: il n'y a donc pas eu de contamination du lot. Les cultures bactériennes à partir du lait sont aussi négatives.

Ce lot montre ainsi une forte hypogalactie qui n'est provoquée que par le surnageant d'une culture de *M. gallisepticum*.

4.2.3. Influence du titre initial des cultures :

Le titre initial de la culture du lot témoin ($0,25 \cdot 10^{10}$ UFC/ml) est très proche de celui du lot témoin positif ($1,75 \cdot 10^{10}$ UFC/ml). Cela nous montre que les titres initiaux n'ont pas apporté de biais à la manipulation ; il faut tout de même nuancer ceci en disant que, si les titres initiaux sont proches, les cinétiques de croissance n'ont peut-être pas été les mêmes : une culture était peut-être en phase décroissante et l'autre non. En effet, *M. agalactiae* et *M. gallisepticum* n'ont probablement pas les mêmes caractéristiques de croissance dans le même milieu, et pas la même physiologie cellulaire. *M. gallisepticum* pousserait plus vite que *M. agalactiae* (il peut y avoir sécrétion ou libération de molécules différentes à des stades différents de croissance). Ceci peut entraîner un biais que nous ne maîtrisons pas.

4.3. Interprétation des résultats :

Le but de cette expérimentation était de caractériser la spécificité d'action du surnageant de la culture de *M. agalactiae* (souche PG2). Il semble que la manipulation n'ait pu le montrer ; en effet, bien que le surnageant de *M. agalactiae* ait eu l'effet escompté, il n'est pas le seul et son effet a paru ici inférieur à celui du surnageant de *M. gallisepticum*. Le surnageant de la culture utilisée en comparaison (*M. gallisepticum*) a aussi un effet hypogalactogène. Pourtant, *M. gallisepticum* n'est pas connu pour être un agent important de mammite chez les petits ruminants. Pourquoi alors dans notre cas son surnageant provoque de tels symptômes ?

Nous ne possédons pas encore d'explication sûre et définitive, mais plusieurs hypothèses sont envisageables :

- Lors des mammites des brebis, ce mycoplasme n'est pas toujours recherché, son importance au niveau de la pathologie de la mamelle est peut-être sous-estimé ; cela paraît tout de même peu vraisemblable ;

- Une autre possibilité est le fait qu'ici nous avons inoculé des surnageants de cultures très riches en mycoplasmes, peu représentatifs de la réalité ; en effet, *in vivo*, ces bactéries ne peuvent que difficilement atteindre un tel degré de développement, aussi soudainement que par inoculation ; le lait n'est pas un aussi bon milieu de culture que celui utilisé pour faire pousser ces bactéries ;

- De plus, les cultures utilisées n'étaient pas des cultures jeunes (3 jours). Les surnageants pouvaient contenir de très nombreux produits issus du métabolisme de bactéries d'une part, et beaucoup de cellules mortes d'autre part, et ceci différemment d'un mycoplasme à l'autre ;

- Il est possible que ces deux bactéries aient des produits du métabolisme ou des protéines qui sont libérés ou sécrétés et qui interagissent avec des éléments du milieu de culture, par ailleurs absents dans la mamelle ; le résultat de ces éventuelles interactions pourrait être pathogène vis-à-vis de la mamelle de manière différente d'un mycoplasme à l'autre ;

- L'action pathogène de *Mycoplasma agalactiae* peut ne pas être spécifique mais commune à d'autres mycoplasmes ; les facteurs pathogènes ne seraient pas des toxines au sens strict, spécifiques à tel ou tel mycoplasme, mais des « toxiques », c'est-à-dire des résidus du métabolisme des bactéries, tels l'oxyde nitreux NO, l'H₂O₂ (VILEI *et al.*,2001, MILES *et al.*,1991), O₂⁻ (MEIER *et al.*,1998), des radicaux libres ou d'autres molécules qui pourraient provoquer de violentes réactions inflammatoires au niveau de l'épithélium sécrétoire mammaire et être à l'origine des hypogalacties ;

- Des mycoplasmes différents possèdent ainsi les mêmes facteurs pathogènes ; l'atteinte d'un organe plutôt qu'un autre reposerait donc sur la présence sur ces mycoplasmes d'adhésines spécifiques d'un organe qui lui permettraient de s'y fixer et de sécréter ces « toxiques ». L'action hypogalactogène du surnageant de lot *Mycoplasma agalactiae* est prévisible vu que ce mycoplasme est pathogène *in vivo* vis-à-vis de la mamelle car il possède les adhésines nécessaires. L'action hypogalactogène voire agalactogène du surnageant de *M. gallisepticum* pourrait alors s'expliquer par le fait que, dans cette expérimentation, nous avons inoculé du surnageant de culture qui contient de nombreux « toxiques » à l'origine des troubles observés ; cependant, dans les conditions naturelles, ce mycoplasme ne possède probablement pas les adhésines nécessaires pour se fixer dans la mamelle, il ne peut pas y rester pour libérer ou sécréter ces facteurs de pathogénicité ; cela expliquerait l'apparente absence de pathogénicité *in vivo* de ce mycoplasme vis-à-vis de la mamelle ;

- La mamelle constitue certes un organe cible et un modèle bien adapté à nos objectifs, mais traduit probablement, d'un point de vue fonctionnel (la production laitière), la moindre inflammation ou modification, de manière nette (sensibilité du modèle). Elle est d'ailleurs régulièrement utilisée pour évaluer le pouvoir pathogène de bactéries opportunistes ou peu virulentes.

4.4. Perspectives :

Cet essai préliminaire semble infirmer le caractère spécifique des effets de *M. agalactiae*.

Notre manipulation servira d'essai pilote à d'autres afin de préciser les résultats obtenus : il serait intéressant de faire la même manipulation en choisissant d'autres mycoplasmes (des mycoplasmes opportunistes comme *M. arginini*) ; nous pouvons surtout utiliser des cultures plus jeunes pour tenter de travailler avec des surnageants contenant peu de débris de cellules mortes, pouvant biaiser les résultats par leur effet inflammatoire ou immunitaire.

Il est donc nécessaire en premier lieu d'établir des cinétiques de croissance de *M. agalactiae* et *M. gallisepticum*, afin d'inoculer des surnageants de cultures jeunes en phase exponentielle. Ces cultures n'auront pas forcément les mêmes anciennetés (« âge »). Des expérimentations utilisant des surnageants de cultures d'âges différents, à partir du même mycoplasme, seraient aussi à réaliser.

Au delà, l'exploration de la nature biochimique des composés actifs devra être entreprise. Elle peut passer en premier lieu par l'inhibition ou la dégradation sélective de constituants connus comme étant libérés par les mycoplasmes, ou même pathogènes (action de lipases, de protéases, de dégradation enzymatique, de la chaleur, d'inhibiteur de radicaux,...).

Conclusion :

Cette expérimentation s'inscrivant dans une série d'autres travaux a permis une avancée relative à la question posée : *Mycoplasma agalactiae*, mycoplasme à fort tropisme mammaire, n'est pas le seul Mollicute à induire *in vivo*, par son surnageant de culture, des effets mimant l'hypogalactie qui le caractérise. Ce résultat est à confirmer dans les directions tracées ci-dessus (discussion).

Cet élément n'empêche pas l'exploration à venir des facteurs du pouvoir pathogène de *M. agalactiae* par l'expérimentation animale. En effet, en l'état actuel des connaissances, ceux-ci semblent être de nature non spécifique (résidus du métabolisme, radicaux oxydatifs,...) et communs à plusieurs membres des Mollicutes. Il n'en irait pas du tout de même du tropisme d'hôte, de tissu et de l'adhésion, qui ne font pas l'objet du présent travail.

ANNEXES

Annexe 1: Production des demi-mamelles des brebis des trois lots, en ml :

Date	J-17	J-12	J-10	J-5	J1	J2	J3	J4
Lot témoin négatif								
demi-mamelle inoculée		250	220	280	210	210	245	230
demi-mamelle non inoculée		260	220	255	205	215	240	225
Lot témoin positif								
4978 G		260	230	255	225	290	270	235
4978 D		300	290	300	205	195	260	245
4911 G	145	150	130	150	200	230	225	220
4911 D	140	150	190	185	190	140	215	215
4743 G		190	225	225	180	240	190	210
4743 D		220	235	275	210	180	210	220
Lot testé								
4903 G		240	230	255	140	185	260	255
4903 D		285	260	310	90	5	1	1
6827 G	205	200	120	160	170	195	215	200
6827 D	215	200	190	170	150	5	30	60
2945 G		95	115	160	130	155	180	180
2945 D		100	135	170	90	15	45	60
3272 G		410	360	390	330	5	30	145
3272 D		260	240	255	145	210	255	230
5205 D		540	520	575	240	45	130	200
-								

Annexe 2: Evolution des ratios côté inoculé/côté non inoculé pour les brebis des trois lots :

	<i>J-12</i>	<i>J-10</i>	<i>J-5</i>	<i>J1</i>	<i>J2</i>	<i>J3</i>	<i>J4</i>
Lot témoin négatif							
<u>5216</u>	0,962	1,000	1,098	1,024	0,977	1,021	1,022
Lot témoin positif							
4978	1,154	1,261	1,176	0,911	0,672	0,963	1,043
4911	1,000	1,462	1,233	0,950	0,609	0,956	0,977
4743	1,158	1,044	1,222	1,167	0,750	1,105	1,048
Moyenne	1,104	1,256	1,211	1,009	0,677	1,008	1,022
Lot testé							
4903	1,188	1,130	1,216	0,643	0,027	0,004	0,004
6827	1,000	1,583	1,063	0,882	0,026	0,140	0,300
2945	1,053	1,174	1,063	0,692	0,097	0,250	0,333
<u>3272</u>	1,577	1,500	1,529	<u>2,276</u>	0,024	0,118	0,630
Moyenne	1,204	1,347	1,218	1,123	0,043	0,128	0,317

Annexe 3: évolution des températures rectales des brebis des trois lots :

dates	J1	J2	J3	J4
lot témoin positif				
6827	38,6	38,7	38,8	38,8
3272	39	38,9	38,8	38,9
4903	39,6	39,2	39,2	39,1
5205	39,5	39,3	39,1	38,6
2945	38,5	38,9	38,9	39,2
lot testé				
4911	39	39,2	39,2	39
4978	38,6	38,9	38,9	38,8
4743	39,2	38,8	38,8	38,6
lot témoin négatif				
5216	38,9	38,9	39,4	39

Annexe 4 : aspect macroscopique des laits des brebis :

Remarque : lorsque le lait est normal, un tiret est noté dans la case correspondante.

	J1	J2	J3	J4
Lot témoin négatif				
5216 G	-	-	-	-
5216 D	-	-	-	-
Lot témoin positif				
4978G	-	-	-	-
4978D	-	-	-	-
4911G	-	Grumeaux	-	-
4911D	-	Grumeaux	-	-
4743G	-	-	-	-
4743D	-	-	-	-
Lot testé				
4903G	Grumeaux	-	-	-
4903D	Grumeaux	Crème	Pas de lait	Pas de lait
6827G	-	-	-	-
6827D	Grumeaux	Peu de lait	Grumeaux	Grumeaux
2945G	-	-	-	-
2945D	Grumeaux	Grumeaux	-	-
3272G	-	Peu de lait	Grumeaux	Grumeaux
3272D	-	-	-	-
5205G	-	-	-	-
5205D	Grumeaux	Grumeaux	-	-

Annexe 5: résultats des palpations des mamelles des brebis pour détecter d'éventuelles indurations : les indurations notées sont indiquées par une croix .

	J1	J2	J3
Lot témoin négatif			
5216G	-	-	-
5216D	-	-	-
Lot témoin positif			
4978G	-	-	-
4978D	-	-	-
4911G	+	-	-
4911D	-	-	-
4743G	-	-	-
4743D	-	-	-
Lot testé			
4903G	-	-	-
4903D	+	+	+
6827G	-	-	-
6827D	+	-	-
2945G	-	-	-
2945D	-	-	-
3272G	-	-	-
3272D	-	-	-
5205G	-	-	-
5205D	+	+	-

Annexe 6: présence des déséquilibre sur les mamelles des brebis des trois lots :
 I représente les côté inoculé et NI celui non inoculé :

	J1	J2	J3	J4
Lot témoin négatif				
5216	-	-	-	-
Lot témoin positif				
4978	NI<I	NI<I	NI<I	NI<I
4911	I<NI	I<NI	I<NI	I<NI
4743	I<NI	I<NI	I<NI	I<NI
Lot testé				
4903	I<NI	I<<NI	I<<NI	I<<NI
6827	I<NI	I<<NI	I<NI	I<NI
2945	I<NI	I<<NI	I<NI	I<NI
3272	I<NI	I<NI	I<NI	I<NI

BIBLIOGRAPHIE

ADMA (Association de défense contre les maladies des Animaux du Béarn et du Pays Basque). Le point sur l'Agalactie Contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques. In : Comptes rendus des Assemblées Générales de l'ADMA. Pau, 1995(22 décembre) : 41-54.

Abu-Amero KK ; Abu-Groun EA ; Halablab MA ; Miles RJ. Kinetics and distribution of alcohol oxidising activity in *Acholeplasma* and *Mycoplasma species*. FEMS. Microbiol. Lett. 2000, Feb 1 ; 183(1) : 147-51.

Ak K ; Ak S ; Gurel A ; Hasoksuz M ; Baran A ; Ozturkler Y ; Ileri Ik ; Minbay A . Experimental studies on the effects of *Mycoplasma agalactiae* on the spermatozoa and genital organs of rams. Pendik. Vet. Mikrobiyol. Dergisi. 1995, 26 :2, 139-155.

Ak S ; Hasoksuz M ; Uysal A ; Ilgaz A ; Minbay A. Serum antibody levels in rams infected with *Mycoplasma agalactiae*. Pendik. Vet. Mikrobiyol. Dergisi. 1996, 27 :2, 215-222.

Ball HJ ; Mackie DP . The ovine mammary gland as an experimental model to determine the virulence of animal ureaplasmas. J. Hyg. 1985, 95 :2, 375-382.

Ball HJ ; Mackie DP. The experimental production of mastitis in ewes as an determinant of the virulence of ovine Ureaplasma strains. Vet. Microbiol. 1985, 10 :2, 117-123.

Ball HJ ; Logan EF ; Campbell JN. *Mycoplasma californicum* mastitis in ewes as an experimental model for antibiotic treatment. Epidemiol. Infect. 1987, 98 :3, 369-378.

Behrens A, Heller M, Kirchoff H, Yogev D, Rosengarten R. a family phase and size variant surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. Infect. Immun. 1994, 62 :5075-84.

Behrens A, Poumarat F, Le Grand D, Heller M, Rosengarten R. A newly identified immunodominant membrane protein (pMB67) involved in *Mycoplasma bovis* surface antigenic variation. Microbiol. 1996, 142 : 2463-70.

Bencina D, Kleven SH, Elfaki MG, Snoj P, Dovc P, dorrer D, Russ I. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. Av. Path. 1994, 23 : 19-36.

Bergonier D. reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse de la brebis : étude bactériologique et sérologique [Mémoire de Diplôme d'Etudes approfondies]. Lyon : Université Claude Bernard -Lyon 1, 1992.85p.

Bergonier D, De Simone F, Russo P, Solsona M, Poumarat F. variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrates with monoclonal antibodies. FEMS. Microbiol. Lett., 1996, 143 : 159-165.

Bergonier D, Poumarat F. Agalactie contagieuse des petits ruminants : épidémiologie, diagnostic et contrôle. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 1996, 2 : 1431-75.

Bergonier D, Poumarat f, Pepin M, Leuret P, Berthelot X. Agalactie contagieuse des petits ruminants : clinique et épidémiologie. P. Vet., 1997, 28 : 180, 31-40.

Bergonier D, Van De Wiele A, Simon JL, Lambert M, Poumarat f, Pepin M, Martel JL, Berthelot X. Contagious agalactia in France : epidemiological situation and control strategies. In : Proc. Workshop « Mycoplasmas of Ruminants : pathogenicity, Diagnostics, epidemiology, and Molecular Genetics ». Alghero, Italy, 1997 (june : 11-13).

Bhugra B, Dybvig K. High-frequency rearrangements in the chromosome of *Mycoplasma pulmonis* correlate with phenotypic switchings. Molec. Microbiol. 1992, 6 : 1149-54.

Bhugra B, Voelker LL, Zou N, Yu H, Dybvig K. Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis* : interwoven, site specific DNA inversion. Molec. Microbiol. 1995, 18 : 703-14.

Blood DC, Radostits OM, Gay CC. Veterinary medicine : a Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 8th ed. Baillière Tindall, 1994 : 908-925.

Bocklisch H ; Kreusel S ; Brys A ; Pftzner H. Experimental infection of the udder of ewes due to *Mycoplasma bovis*. J. Vet. Med. Series-B. 1991, 38 : 5 , 385-390.

Boothby JT ; Jasper DE ; Thomas CB. Experimental intra-mammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows : effect on milk production and milk quality. Canad. J. Vet. Res. 1986, 50 : 2 , 200-204.

Boothby JT ; Jasper DE ; Thomas CB. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows : effects on the mycoplasmal infection and cellular inflammatory response. Cornell. Vet. 1986, 76 : 2, 188-197.

Boothby JT ; Schore CE ; Jasper DE ; Osburn BI ; Thomas CB. Immune responses to *Mycoplasma bovis* vaccination and experimental infection in the bovine mammary gland. Canad. J. Vet. Res. 1988, 52 : 3, 355-359 ; 27 ref.

Boothby JT ; Jasper DE ; Thomas CB. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows : effects on local and systemic antibody response. Canad. J. Vet. Res. 1987, 51 : 1 , 121-125.

Boyer MJ, Wise K. Lipid-modified surface protein antigens expressing size variation within the species *Mycoplasma hyorhinis*. Infect. Immun. 1989, 57 : 245-254.

Bridre J, Donatien A. Le microbe de l'agalactie contagieuse et sa culture in vitro. C. R. Acad. SC. Paris, 1923, 177 : 841-843.

Brooks DL ; DaMassa AJ ; Adler HE. Caprine mycoplasmosis : immune response in goats to *Mycoplasma putrefaciens* after intramammary inoculation. Am. J. Vet. Res. 1981, 42 : 11, 1898-1900.

Chavez Gonzalez YR, Ros Bascunana CR, Bolske G, Mattsson JG, Fernandez Molina CF, Johansson KE. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. Vet. Microbiol., 1995 ; 47 : 183-190.

Citti C, Rosengarten R. Mycoplasma genetics variation and its implication for pathogenesis. Wien. Klin. Wochenschr. 1997, 109 : 14-15, 562-568.

Citti C, Watson-McKown R, Mow M Wise Ks. Intraspecies plasticity of vlp gene structure in *Mycoplasma hyorhnis*. Abstr. Gen. Meet Am. Soc. ; Microbiol, p 282 (abstract G4).

Droesse M, Tangan G, Gummelt I, Kirchhoff H, Washburn LR, Rosengarten R. major membrane proteins and lipoproteins as highly variable immunogenic surface components and strain-specific antigenic markers of *Mycoplasma arthridis*. Microbiol. 1995, 141 : 3207-19.

Duquesnoy F. Modification de la production laitière par inoculation intramammaire chez la brebis d'un surnageant de culture de *Mycoplasma agalactiae*. 105p.
Thèse : Méd. Vét. : Toulouse : 2000 ; 2000-TOU-3-4079.

Dumitrescu M ; Gavrilă VR ; Gavrilă LB ; Ghetea L ; Grecu C ; Alexandru G ; Talmaci-Basalic R ; Stefan M ; Petrescu A ; Miheascu G ; Scorpan V ; Bujorean V ; Jacota A ; Bucur E ; Pascale F ; Vior C ; Gavrilă L. Biochemical and cytogenetical study of the mycoplasmal antigen and of the cyclophosphamide action in mammalians, in vivo. The action of some immunomodulatory antioxidants. Roum. Arch. Microbiol. Immunol. 1996 Jul-Sep ; 55(3) : 225-39.

Feng SH, Lo SC. Lipid extract of *Mycoplasma penetrans* proteinase K-digested lipid-associated membrane proteins rapidly activates NF-kappaB and activator protein 1. Infect. Immun. 1999, 67 :3, 2951-6.

Fleischmann R, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. Rd. Science. 1995, 269 : 496-512.

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischman RD. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Sci. 1995, 270 : 397-403.

Garcia J, Lemercier B, Roman-Roman S, Rawadi G. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. J. Biol. Chem. 1998, 273 : 51, 34391-8.

Glew M, Marena M, Bergonier D, Rosengarten R, Citti C. Locus involved in the antigenic variation of *Mycoplasma agalactiae*. In Proc. Workshop COST Action 826, June 2-4, 1999.

Hasebe A, Shibata K, Domon H, Dong L, Watanabe T. Partial purification and characterisation of the active entity responsible for inducing interleukin-6 production by human gingival fibroblasts from *Mycoplasma salivarium* cells. Microbiol. Immunol. 1999 ; 43 (11) : 1003-8.

Hasso SA ; Al-Aubaidi JM ; Al-Darraj AM. Contagious agalactia in goats : its severity as related to the route of infection and pregnancy. Small. Rum. Res. 1993 ;10 :3 , 263-275.

- Hasso SA ; Al-Aubaidi JM ; Al-Darraji AM. Pathology of experimentally induced contagious agalactia in goats. *Small. Rum. Res.* 1994, 13 :1, 79-84.
- Hasso SA, Al-Omran AH. Antibody response patterns in goats experimentally infected with *Mycoplasma agalactiae*. *Small. Rum. Res.* 1994, 14 : 1, 79-81.
- Himmelreich R, Hillbert H, Plagens H, Pirki E, Li BC, Hermann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumopniae*. *Nucl. Acids. Res.* 1996, 24 : 4420-4449.
- Horvath G, Stipkovits L, Varga Z, Zoldag L, Meszaros J. infection of cows by *Mycoplasma bovis*. *Arch. Exp. Vet.* 1983, 37 : 3, 401-403.
- Jones GE. The pathogenicity of some ovine or caprine mycoplasmas in the lactating mammary gland of sheep and goats. *J. Comp. Path.* 1985, 95 : 3, 305-318.
- Kennedy S ; Ball HJ. Pathology of experimental ureaplasma mastitis in ewes. *Vet. Path.* 1987, 24 :4, 302-307.
- Kobt M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8 :3, 411-26.
- Ladefoged SA, Birkelund S, Hauge S, Brock B , Jensen I, Christiansen G. A 135-kilodalton surface antigen of *Mycoplasma hominis* PG21 contains multiple directly repeated sequences. *Infect. Immun.* 1995, 63 : 212-223.
- Le Grand D. La variabilité antigénique membranaire de *Mycoplasma bovis*. Evaluation et rôles. Thèse d'université, Université Claude Bernard Lyon 1, 1996 ; 286p.
- Ley D ; Yoder H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Diseases of poultry* 10th Edition. 1997 : 194-203.
- MacOwan KJ, Brand TF, McGillveary N, Hunter AR. Experimental infection of castrated lambs with *Mycoplasma agalactiae*. *J. Hyg.* 1984, 93 : 3, 455-463.
- Meier B. Superoxide release in human fibroblasts upon treatment with culture supernatants of arthritogenic bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Mycoplasma arthridis*. *Z-Naturforsch.* 1998, 53 : 3-4 , 254-63.
- Meier B ; Habermehl GG. Evidence for superoxide dismutase and catalase in Mollicutes and release of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990 Feb 15 ; 277(1) : 74-9.
- Meszaros MJ, Horvath G, Stipkovits L, Varga Z. Gross and histopathological studies on experimental *Mycoplasma* mastitis in cows. *Magyer. Allatorvosok. Lapja.* 1987, 42 :2, 97-103.
- Miege R. Le foyer d'Agalactie contagieuse des chèvres des deux Savoies. *Revue. Med. Vet.* 1978, 129 : 247-259.

- Mikhailova L. Infection and immunity in mycoplasmosis. Bacteraemia in experimental agalactiae in sheep and goats. *Izvestiya. Mikrobiol. Inst. Sofia.* 1974, No. 25, 47-51.
- Miles RJ, Taylor RR, Varsani H. Oxygen uptake and H₂O₂ production by fermentative *Mycoplasma spp.* *Med. Microbiol.* 1991, 34(4) : 219-23.
- Misri J, Gupta PP, Ahuja SP. Biochemical changes in milk in experimental mycoplasma mastitis in goats. *Act. Vet. Brno.* 1988, 57 : 1-2, 19-30.
- Morovitz HJ, The completeness analysis of molecular biology. *Isr. J. Med. Sci.* 1984, 20 : 750-753.
- Nicolet J. Animal mycoplasmoses : a general introduction. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1996, 15(4) : 1233-1240.
- Nurit M. Reproduction expérimentale des mammites à *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis : activité biologique des surnageants de culture. 46 p.
Thèse : Méd. Vét. :Toulouse : 2001 ; 2001-TOU-3-4127.
- Perreau P. Les mycoplasmoses de la chèvre. *Cah. Med. Vet.* 1979, 48 : 71-85.
- Petersen SN, Bailey CC, Jensen JS, Borre MB, King ES, Bott KF, Hutchinson CA. Characterisation of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome : possible role in the generation of antigenic variation. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92 : 11829-33.
- Poumarat F, Perrin B, Longchambon D. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunoblotting on membrane filtration (Mfdot). *Vet. Microbiol.* 1991, 29 : 329-38.
- Poumarat F, Le Grand D, Bergonier D. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité génétique. *Le point Vétérinaire*, 1997, 28 : 180, 13-22.
- Rawadi G ; Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1996 Feb ; 64(2) : 637-43.
- Rawadi G ; Ramez V ; Lemercier B ; Roman-Roman S. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in murine macrophages : involvement in cytokine synthesis. *J. Immunol.* 1998 Feb 1 ; 160(3) : 1330-9.
- Razin S. Comparative genomics of mycoplasmas. 1997, 109 : 14-15, 551-556.
- Reilly GAC, Kennedy S, McAliskey M, Ball HJ. The pathology of experimental *Mycoplasma californicum* mastitis in ewes. *J. Comp. Path.* 1993, 109 : 2, 155-161.
- Rosengarten R, Wise K. Phenotypic switching in mycoplasmas : phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science*, 1990, 247 : 315-318.
- Rosengarten R, wise K. The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis* : combinatorial expression of distinct size-variant. 1991, 173 : 4782-4783.

- Rosengarten R, Levisohn S, Yogev D. A 41 kDa variable surface protein of *Mycoplasma gallisepticum* has a counterpart in *Mycoplasma irritans* and *Mycoplasma iowae*. FEMS. Microbiol. Lett. 1995, 32 : 115-123.
- Sanchis R, Abadie G, Lambert M, Cabasse E, Guibert JM, Calamal M, Dufour P, Vignoni M, Pepin M. Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs. Small. Rum. Res. 1997, 27 : 1, 31-39.
- Shabanov M, Toshkov A, Mikhailova L, Shirova L. Mastitis produced experimentally by *Mycoplasma agalactiae* in ewes. Vet. Nauki., Bulgaria. 1973, 10 : No. 10, 81-84.
- Shabanov M, Georgiev D, Mikhailova L, Shirova L, Toshkov A. Studies on the infectious and immunization processes in mycoplasmosis. IX. Experimental infection with *Mycoplasma agalactiae* in hamsters. Act. Microbiol. Virol. Immunol. 1976, N° 4, 58-65.
- Sher T, Ehrlich Y, Rottem S. Mycoplasma in the spotlight of AIDS : partial biochemical characterization of mycoplasma-derived components inducing TNF alpha secretion and blast transformation. Indian.J. Biochem. Biophys. 1997, 34 : 1-2, 6-10.
- Simmons WL, Zuhua C, Glass J, Simecka JW, Cassel GH, Watson HL. Sequence analysis of the chromosomal region around and within the V-1 encoding gene *Mycoplasma pulmonis* : evidence for DNA inversion as a mechanism for V-1 variation. Infect. Immun. 1996, 64 : 472-9.
- Singh N, Rajya BS, Mohanty GC. Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. Cornell-Veterinarian. 1974, 64 : No. 3, 435-442.
- Singh N, Rajya BS, Mohanty GC. Pathology of *Mycoplasma agalactiae* induced granular vulvovaginitis (GVV) in goats. Cornell-Veterinarian. 1975, 65 : 3, 363-373.
- Solsona M, Lambert M, Poumarat F. Genomic protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. Vet. Microbiol. 1996, 50 : 45-58.
- Taoudi A, Johnson DW, Kheyyali D, Khirchoff H. Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* in sheep after experimental infection. Vet. Microbiol. 1987, 14 : 2, 137-144.
- Theiss P, Karpas a, Wise K. Antigenic topology of the P29 surface lipoprotein of *Mycoplasma fermentans* : differential display of epitopes results in high-frequency phase variation. Infect. Immun. 1996, 64 : 1800-1809.
- Toshkov A, Mikhailova L, Shirova L, Shabanov. M. Infection and immunity in mycoplasmosis. I. Experimental agalactia in sheep and goats. Izvestiya., Mikrobiol. Inst. Sofia. 1974, No. 25, 39-45.
- Toshkov A, Mikhailova L, Shirova L, Shabanov. Studies of the infectious and immune processes in mycoplasmosis. V. Experimental infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs. Act. Microbiol. Virol. Immunol. 1975, No.2, 42-47.
- Tully JG, Bove JM, Laigret F, Witcomb RF. Revised taxonomy of the Class Mollicutes : proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal

rank (Entomoplasmatales ord. Nov.) with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmatacae) from helical species (Spiroplasmatacae), and emended description of the Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmatacae. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993, 43 : 378-385.

Vilei EM, Frey J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC : its impact on H₂O₂ production and virulence. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2001, 8 : 85-92.

Watson HL, McDaniel LS, Blalock DK, Fallon MT, Cassel GH. Heterogeneity among strains and a high rate of variation within strains of a major surface antigen of *Mycoplasma pulmonis*. Infect. Immun., 1988, 56 : 1358-63.

Watson HL, Zheng X, Cassel GH. Structural variation and switching of Mycoplasma antigen. Clin. Inf. Dis., 1993, 17 : 183-186.

Wise KS. Adaptive surface variation in mycoplasmas. Trends Microbiol., 1993, 1 : 59-63.

Yogev D, Watson-McKown R, Rosengarten R, Im J, Wise KS. Increased structural and combinatorial diversity in an extended family of genes encoding Vlp surface proteins of *Mycoplasma hyorhinis*. J. Bacteriol. 1995, 177 : 5836-43.

Zavagli V. L'agalactie contagieuse des brebis et des chèvres. Bull. Off. Int. Epizoot. 1951,36 :336-362.

Zeng X, Tengh LJ, Watson HL, Glass JI, Blanchard A, Cassel GH. Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated within antigen size variation ? Infect. Immun. 1995, 93 : 891-8.

Toulouse, 2002

NOM : HABERT

PRENOM : Guillaume, Philippe

TITRE : Comparaison *in vivo* de l'effet agalactogène de surnageants de culture de deux mycoplasmes.

RESUME :

L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer la spécificité de l'action pathogène du surnageant d'une culture de *Mycoplasma agalactiae* par rapport au surnageant d'un autre mycoplasme témoin.

L'auteur procède d'abord à un rappel concernant les mycoplasmes en général, puis les deux mycoplasmes utilisés dans cette manipulation et les pathologies associées : *Mycoplasma agalactiae* et *Mycoplasma gallisepticum*.

Dans une seconde partie, l'expérimentation est détaillée : deux lots de brebis sont inoculées par voie intra-mammaire avec deux surnageants différents, l'un de *M. agalactiae* et l'autre de *M. gallisepticum* ; un troisième lot de brebis sert de témoin négatif.

L'inoculation des deux surnageants provoque des hypogalacties unilatérales (côté inoculé), contrairement au lot témoin. L'effet hypogalactogène de *M. gallisepticum* est plus important que celui de *M. agalactiae*.

Cet essai préliminaire infirme la spécificité du surnageant de culture de *M. agalactiae* comme agent d'hypogalacties expérimentales. En effet, un mycoplasme pathogène des volailles et non de la mamelle provoque un effet similaire. D'autres manipulations devront ainsi avoir lieu pour mieux comprendre la pathogénie de *M. agalactiae*.

Ces premiers résultats ne contredisent pas la thèse actuelle concernant le pouvoir pathogène des mycoplasmes : action de catabolites ou de « toxiques » jouant le rôle d'oxydant, ainsi que d'enzymes.

MOTS CLES : Mycoplasme, Mammite, Inoculation, Surnageant, Agalactie Contagieuse, *Mycoplasma agalactiae*, Pathogénie.

ENGLISH TITLLE : *In vivo* comparison of agalactia induced by supernatants of two mycoplasma cultures.

ABSTRACT :

The aim of this experimentation was to estimate the specificity of *Mycoplasma agalactiae* culture supernatant pathogenicity in comparison with supernatant of another mycoplasma.

Firstly, a reminder about mycoplasmas in general is made, then the two mycoplasmas used in this experimentation and their pathologies are described: *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma gallisepticum*.

The experimentation is detailed in the second part : intramammary inoculation of two different supernatants (*M. agalactiae* and *M. gallisepticum*) are carried out in two groups of ewes ; a third group served as a control group.

The inoculation of the two supernatants induced unilateral hypogalactia unlike the control group. Hypogalactia induced by *M. gallisepticum* is greater than *M. agalactiae*'s.

This first experiment invalidate specificity of *M. agalactiae* supernatant as the agent of experimental hypogalactia. Indeed, another mycoplasma, pathogenic on poultry and not on mammary gland, induced a similar effect. Others experimentations should be performed to understand pathogenicity of *M. agalactiae*.

These first results do not contradict the actual argument about the pathogenicity of mycoplasmas : intervention of catabolites or « toxics » as oxydative agents, or intervention of enzymes.

KEY WORDS : Mycoplasmas, Mastitis, Inoculation, Supernatant, Contagious Agalactia, *Mycoplasma agalactiae*, Pathogenicity.