

Année 2008

**INFLUENCE, DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT  
DES INFECTIONS PAR LES MYCOPLASMES EN  
REPRODUCTION CANINE : COMPARAISON  
AVEC LES DONNÉES ACQUISES  
DANS LES ESPÈCES HUMAINE ET BOVINE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le.....

par

**Maryne, Floriane, Mélodie DEL MISSIER**

Née le 1<sup>er</sup> juillet 1982 à Châtenay-Malabry (Hauts-de-Seine)

JURY

**Président : M.**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

**Membres**

**Directeur : M. FONTBONNE Alain**

**Maître de conférences à l'ENVA**

**Assesseur : M. BOULOUIS Henri-Jean**

**Professeur à l'ENVA**



## **LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard  
Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

### **DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

**Chef du département : Mme COMBRISSE Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences**

|                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b><br>Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur<br>M. DEGUEURCE Christophe, Professeur*<br>Mme ROBERT Céline, Maître de conférences<br>M. CHATEAU Henri, Maître de conférences | <b>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b><br>M. CRESPEAU François, Professeur<br>M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur *<br>Mme BERNEX Florence, Maître de conférences<br>Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences |
| <b>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b><br>Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur*<br>M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur                                                                      | <b>- UNITE DE VIROLOGIE</b><br>M. ELOIT Marc, Professeur *<br>Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences                                                                                                                                 |
| <b>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b><br>M. BRUGERE Henri, Professeur<br>Mme COMBRISSE Hélène, Professeur*<br>M. TIRET Laurent, Maître de conférences                                                              | <b>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES</b><br>M. MOUTHON Gilbert, Professeur                                                                                                                                       |
| <b>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b><br>Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur *<br>M. TISSIER Renaud, Maître de conférences<br>M. PERROT Sébastien, Maître de conférences                                                 | <b>-UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b><br>M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur<br>Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences                                                                                                  |
| <b>-UNITE : BIOCHIMIE</b><br>M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences<br>M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences                                                                                                    | <b>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b><br>M. DEPUTTE Bertrand, Professeur                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                            | <b>-DISCIPLINE : ANGLAIS</b><br>Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié                                                                                                                                                   |

### **DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)**

**Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>- UNITE DE MEDECINE</b><br>M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur*<br>Mme CHETBOUL Valérie, Professeur<br>M. BLOT Stéphane, Maître de conférences<br>M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences<br>Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences                                                                                                                                                                                                                                        | <b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b><br>M. FAYOLLE Pascal, Professeur *<br>M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences<br>M. MOISSONNIER Pierre, Professeur<br>Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences<br>Mme RAVARY Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br>M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel<br>M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel |
| <b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b><br>M. DENOIX Jean-Marie, Professeur<br>M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences*<br>Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel<br>Melle PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel                                                                                                                                                                                                                                      | <b>- UNITE DE RADIOLOGIE</b><br>Mme BEGON Dominique, Professeur*<br>Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b><br>Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP)<br>M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences<br>M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences<br>M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)<br>M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences<br>Mlle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br>Melle DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) | <b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b><br>Mlle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b><br>M. CHERMETTE René, Professeur<br>M. POLACK Bruno, Maître de conférences*<br>M. GUILLOT Jacques, Professeur<br>Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel<br>Mlle HALOS Lénia, Maître de conférences                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION</b><br>M. PARAGON Bernard, Professeur *<br>M. GRANDJEAN Dominique, Professeur                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

### **DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)**

**Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences**

|                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b><br>M. BENET Jean-Jacques, Professeur*<br>Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences<br>Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences                                                                         | <b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b><br>M. COURREAU Jean-François, Professeur<br>M. BOSSE Philippe, Professeur<br>Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur<br>Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences<br>M. ARNE Pascal, Maître de conférences<br>M. PONTER Andrew, Maître de conférences* |
| <b>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b><br>M. BOLNOT François, Maître de conférences *<br>M. CARLIER Vincent, Professeur<br>Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences<br>M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences | <b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b><br>M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences*<br>Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP)<br>M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences<br>M. ADJOU Karim, Maître de conférences                          |
| <b>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES</b><br>M. SANAA Moez, Maître de conférences                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

\* Responsable de l'Unité Mme GIRAUDET Aude Clinique équine, Ingénieur de recherche



# REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Président du jury,**

**Professeur à la faculté de médecine de Créteil,**

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

Hommage respectueux.

**A Monsieur Alain FONTBONNE,**

**Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,**

Pour sa gentillesse et son aide dans la réalisation de ce travail.

Sincères remerciements.

**A Monsieur Henri-Jean BOULOUIS,**

**Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,**

Pour sa participation bienveillante à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.



**A mes parents Jocelyne et Daniel,**

Merci pour votre soutien indéfectible depuis toujours.

Merci pour tout ce que vous m'avez transmis.

Je vous dois tant...

**A mon frère Matthieu,**

La vie ne serait pas aussi belle sans ta fantaisie.

Je te souhaite beaucoup de réussite dans les années à venir.

**A Manuelle et à Valérie,**

Ne nous perdons jamais de vue malgré la distance.

**A toute ma famille et à tous mes amis,**

Merci pour tous ces bons moments passés auprès de vous.





# INFLUENCE, DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DES INFECTIONS PAR LES MYCOPLASMES EN REPRODUCTION CANINE : COMPARAISON AVEC LES DONNEES ACQUISES DANS LES ESPECES HUMAINE ET BOVINE

DEL MISSIER Maryne

## **Résumé**

Les mycoplasmes, procaryotes dépourvus de paroi, sont caractérisés par des conditions de culture difficiles in vitro. C'est pourquoi la description des différentes espèces est aujourd'hui actualisée grâce aux méthodes d'identification génétique.

Leur influence en reproduction canine est encore peu documentée et *Mycoplasma canis* est la principale espèce soupçonnée de provoquer de l'infertilité. La démonstration de la pathogénicité de nombreuses espèces appartenant aux genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma* en reproduction bovine et humaine doit encourager de plus amples investigations chez l'espèce canine.

En routine, le diagnostic d'une mycoplasmosé canine est toujours freiné par la difficulté de dénombrer ces bactéries, surtout si la localisation de l'infection supposée est réputée pour héberger des mycoplasmes commensaux.

L'émergence d'antibiorésistance envers chaque famille d'antibiotiques réputée active contre les Mollicutes montre la nécessité de standardiser l'obtention d'antibiogrammes.

**Mots clés** : MYCOPLASME / MYCOPLASMA / UREAPLASME / UREAPLASMA / MOLLICUTE / REPRODUCTION / INFERTILITE / CARNIVORE / CHIEN / HOMME / BOVIN.

## **Jury** :

Président : Monsieur le Professeur

Directeur : Dr. Alain FONTBONNE

Assesseur : Pr. Henri-Jean BOULOUIS

## **Adresse de l'auteur** :

Melle DEL MISSIER Maryne

6 rue du docteur Calmette 91430 IGNY

# INFLUENCE, DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MYCOPLASMOSIS IN CANINE THERIOGENOLOGY : COMPARISON WITH ESTABLISHED DATA IN HUMAN AND BOVINE SPECIES

DEL MISSIER Maryne

## **Summary**

Mycoplasmas, which are prokariotic cells without wall, are very difficult to grow in laboratories. That's why species description is actually updated thanks to new genetic fingerprinting methods.

Their influence upon canine theriogenology is always little described and *Mycoplasma canis* is the most suspected species to provide infertility.

Pathogenicity proving for several mycoplasmas belonging to the genus *Ureaplasma* and *Mycoplasma* in bovine theriogenology and human medicine must lead to further investigations in canine theriogenology.

In daily routine, diagnosis of canine mycoplasmosis is restrained because of the difficulty of cell counting, especially if place of presume contagion is known for host commensal mycoplasmas.

New antibioresistance against each family of antibiotics which is usually active against mollicutes show necessity to standardize antibiograms achievement.

**Keywords** : MYCOPLASM / MYCOPLASMA / UREAPLASM / UREAPLASMA / MOLLICUTE / THERIOGENOLOGY / INFERTILITY / CARNIVORE / DOG / MAN / BOVINE.

## **Jury** :

President : Pr.

Director : Dr. Alain FONTBONNE

Assessor : Pr. Henri-Jean BOULOUIS

## **Author's address:**

Melle DEL MISSIER Maryne

6 rue du docteur Calmette 91430 IGNY

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLE DES ILLUSTRATIONS .....                                                                                | 7  |
| GLOSSAIRE.....                                                                                               | 9  |
| INTRODUCTION.....                                                                                            | 11 |
| I. Définition et classification des mycoplasmes hébergés chez les espèces canine,<br>humaine et bovine ..... | 13 |
| A. Définition des mycoplasmes .....                                                                          | 13 |
| 1. Caractères généraux des mycoplasmes .....                                                                 | 13 |
| a) Taille et génome .....                                                                                    | 13 |
| b) Morphologie des colonies .....                                                                            | 14 |
| 2. Croissance des mycoplasmes .....                                                                          | 14 |
| a) Propriétés physiques et chimiques .....                                                                   | 14 |
| b) Métabolisme et multiplication.....                                                                        | 15 |
| c) Conditions de résistance dans le milieu extérieur .....                                                   | 15 |
| B. Méthodes d'identification des mycoplasmes .....                                                           | 16 |
| 1. Opérations préalables à l'identification des mycoplasmes .....                                            | 16 |
| a) Transport et conservation des prélèvements .....                                                          | 16 |
| b) Purification des cultures .....                                                                           | 17 |
| c) Observation des cellules et des colonies .....                                                            | 17 |
| 2. Relation entre le milieu de culture et l'identification des mycoplasmes.....                              | 18 |
| a) Critères biochimiques déterminant l'appartenance à une famille ou à un<br>genre de mycoplasme .....       | 18 |
| (1) Capacité de croissance en présence de stérols .....                                                      | 18 |
| (2) Capacité de croissance en présence de digitonine.....                                                    | 18 |
| (3) Utilisation de l'urée .....                                                                              | 19 |
| b) Critères biochimiques déterminant l'appartenance à une espèce de mycoplasme                               | 20 |
| (1) Fermentation du glucose .....                                                                            | 20 |
| (2) Hydrolyse de l'arginine .....                                                                            | 21 |
| (3) Activité phosphatasique .....                                                                            | 21 |
| c) Milieux d'identification disponibles pour la culture des mycoplasmes.....                                 | 21 |
| (1) Choix de la consistance du milieu.....                                                                   | 21 |
| (2) Choix de la composition du milieu .....                                                                  | 22 |
| (a) Culture du genre <i>Mycoplasma</i> .....                                                                 | 22 |

|     |                                                                                                                                    |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (b) | Culture du genre <i>Ureaplasma</i> .....                                                                                           | 23 |
| 3.  | Méthodes d'identification sérologiques des mycoplasmes .....                                                                       | 24 |
| a)  | Préparation d'un antisérum spécifique de l'espèce recherchée.....                                                                  | 24 |
| b)  | Principe et interprétation du test d'inhibition de croissance .....                                                                | 26 |
| c)  | Principe et interprétation du test d'inhibition métabolique.....                                                                   | 28 |
| d)  | Principe et interprétation du test utilisant l'immunofluorescence.....                                                             | 28 |
| e)  | Principe et interprétation du test utilisant les immunoperoxydases .....                                                           | 28 |
| f)  | Principe et interprétation de la technique utilisant la MF dot .....                                                               | 29 |
| 4.  | Spéciation à l'aide du génie génétique .....                                                                                       | 32 |
| a)  | Polymérisation en chaîne ou PCR.....                                                                                               | 32 |
| b)  | Hybridation <i>in situ</i> à l'aide de sondes ribonucléiques.....                                                                  | 33 |
| c)  | Association PCR-RFLP.....                                                                                                          | 34 |
| C.  | Classification des mycoplasmes.....                                                                                                | 35 |
| 1.  | Classification des genres de mycoplasmes.....                                                                                      | 35 |
| 2.  | Classification obtenues à l'aide des cultures et des méthodes sérologiques .....                                                   | 37 |
| a)  | Chez le chien .....                                                                                                                | 37 |
| b)  | Chez l'homme .....                                                                                                                 | 38 |
| c)  | Chez les bovins.....                                                                                                               | 38 |
| 3.  | Classifications obtenues à l'aide du génie génétique .....                                                                         | 40 |
| a)  | Chez le chien .....                                                                                                                | 40 |
| (1) | Par séquençage de l'ARN ribosomal 16S .....                                                                                        | 40 |
| (2) | Par séquençage de la région inter génique espaçant les séquences des<br>ARN ribosomaux 16S et 23S .....                            | 42 |
| b)  | Chez les autres espèces .....                                                                                                      | 43 |
| D.  | Relation avec l'hôte animal.....                                                                                                   | 44 |
| 1.  | Lieux de colonisation des organismes animaux par les mycoplasmes.....                                                              | 44 |
| 2.  | Spécificité de la relation.....                                                                                                    | 46 |
| 3.  | Influence de l'antibiothérapie sur la relation hôte mycoplasme .....                                                               | 46 |
| II. | Influence des mycoplasmes sur la reproduction canine : comparaison des données<br>acquises dans les espèces humaine et bovine..... | 49 |
| A.  | Pouvoir pathogène des mycoplasmes.....                                                                                             | 49 |
| 1.  | Pouvoir pathogène à l'échelle cellulaire .....                                                                                     | 49 |
| a)  | Subversion et exploitation de cellules hôtes .....                                                                                 | 49 |
| (1) | Adhérence cellulaire.....                                                                                                          | 49 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| (2) Invasion et fusion cellulaire .....                                          | 49 |
| (3) Modification de la motricité cellulaire et ciliaire .....                    | 50 |
| b) Action immunomodulatrice.....                                                 | 51 |
| 2. Pouvoir pathogène à l'échelle moléculaire .....                               | 51 |
| a) Hypervariabilité antigénique .....                                            | 52 |
| b) Adhésion aux récepteurs sulfoglycolipidiques.....                             | 53 |
| c) Induction de la synthèse de composés cytotoxiques et de cytokines .....       | 54 |
| B. Influence des mycoplasmes en reproduction .....                               | 55 |
| 1. Isolement des mycoplasmes dans le tractus urogénital des individus sains..... | 55 |
| a) Dans l'espèce humaine.....                                                    | 55 |
| b) Dans l'espèce bovine.....                                                     | 55 |
| c) Dans l'espèce canine .....                                                    | 56 |
| 2. Association des mycoplasmes avec les infections du tractus urogénital .....   | 57 |
| a) Dans l'espèce humaine.....                                                    | 58 |
| (1) Infections naturelles du tractus génital.....                                | 58 |
| (a) Chez l'homme .....                                                           | 58 |
| (b) Chez la femme.....                                                           | 58 |
| (2) Infections naturelles du tractus urinaire .....                              | 59 |
| b) Dans l'espèce bovine.....                                                     | 60 |
| (1) Infections naturelles du tractus génital.....                                | 60 |
| (a) Chez le taureau .....                                                        | 60 |
| (b) Chez la vache .....                                                          | 60 |
| (2) Infections expérimentales du tractus génital .....                           | 61 |
| (a) Chez le taureau .....                                                        | 61 |
| (b) Chez la vache .....                                                          | 61 |
| c) Dans l'espèce canine .....                                                    | 62 |
| (1) Infections naturelles du tractus génital.....                                | 62 |
| (a) Chez le mâle .....                                                           | 62 |
| (b) Chez la femelle.....                                                         | 62 |
| (2) Infections naturelles du tractus urinaire .....                              | 63 |
| (3) Infection expérimentales .....                                               | 64 |
| (a) Chez le mâle .....                                                           | 64 |
| (b) Chez la femelle.....                                                         | 66 |

|      |                                                                 |    |
|------|-----------------------------------------------------------------|----|
| 3.   | Influence des mycoplasmes sur la qualité du sperme .....        | 67 |
| a)   | Chez l'homme .....                                              | 67 |
| b)   | Chez le taureau .....                                           | 68 |
| c)   | Chez le chien .....                                             | 68 |
| 4.   | Influence des mycoplasmes sur la gestation .....                | 69 |
| a)   | Chez la femme.....                                              | 69 |
| b)   | Chez la vache .....                                             | 70 |
| c)   | Chez la chienne .....                                           | 71 |
| 5.   | Mycoplasmes et infections néonatales .....                      | 72 |
| a)   | Chez le nouveau né .....                                        | 72 |
| b)   | Chez le veau .....                                              | 73 |
| c)   | Chez le chiot.....                                              | 73 |
| III. | Diagnostic et traitement des mycoplasmoses en reproduction..... | 77 |
| A.   | Diagnostic des infections provoquées par les mycoplasmes.....   | 77 |
| 1.   | Diagnostic différentiel des mycoplasmoses urogénitales.....     | 77 |
| a)   | Dans l'espèce humaine.....                                      | 77 |
| b)   | Dans l'espèce bovine.....                                       | 77 |
| c)   | Dans l'espèce canine .....                                      | 78 |
| (1)  | Pathologie infectieuse .....                                    | 78 |
| (a)  | Brucellose.....                                                 | 78 |
| (i)  | Manifestations cliniques.....                                   | 78 |
| (ii) | Diagnostic.....                                                 | 79 |
| (b)  | Herpesvirose.....                                               | 79 |
| (i)  | Manifestations cliniques.....                                   | 79 |
| (ii) | Diagnostic.....                                                 | 79 |
| (c)  | Autres maladies infectieuses .....                              | 80 |
| (2)  | Pathologie endocrinienne .....                                  | 81 |
| 2.   | Prélèvements et méthodes d'identification actuelles .....       | 81 |
| a)   | Dans l'espèce humaine.....                                      | 82 |
| b)   | Dans l'espèce bovine.....                                       | 83 |
| c)   | Dans l'espèce canine .....                                      | 83 |
| 3.   | Interprétation du résultat .....                                | 85 |
| a)   | En fonction du lieu de prélèvement.....                         | 85 |

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| (1) Dans l'espèce humaine .....                       | 85  |
| (2) Dans l'espèce canine .....                        | 85  |
| b) En fonction du dénombrement bactérien .....        | 86  |
| (1) Dans l'espèce humaine .....                       | 86  |
| (2) Dans l'espèce canine .....                        | 86  |
| B. Traitement des mycoplasmoses.....                  | 86  |
| 1. Antibiosensibilité naturelle des mycoplasmes ..... | 86  |
| a) Obtention d'un antibiogramme .....                 | 87  |
| (1) Dans l'espèce humaine .....                       | 87  |
| (2) Dans les espèces d'intérêt vétérinaire .....      | 89  |
| b) Prévion de la sensibilité <i>in vivo</i> .....     | 91  |
| c) Limites de l'utilisation de l'antibiogramme .....  | 93  |
| d) Résistance acquise des mycoplasmes.....            | 93  |
| 2. Posologie et durée des traitements .....           | 94  |
| a) Recommandations chez l'homme .....                 | 94  |
| b) Recommandations chez les bovins.....               | 95  |
| c) Recommandations chez le chien .....                | 95  |
| CONCLUSION .....                                      | 97  |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....                     | 99  |
| ANNEXES .....                                         | 111 |





## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Figures

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Exemple de composition d'un bouillon de culture de type Hayflick modifié.<br>D'après Rodriguez <i>et al.</i> (68).....                                                                             | 23 |
| Figure 2 : Exemple de composition d'un bouillon de culture de Shepard. D'après<br>Rodriguez <i>et al.</i> (68).....                                                                                           | 24 |
| Figure 3 : Dessin d'un anneau support du test d'inhibition de croissance .....                                                                                                                                | 27 |
| Figure 4 : Classification simplifiée des genres de mycoplasmes. D'après Euzéby (26)<br>et Rosenbusch (73). ....                                                                                               | 36 |
| Figure 5 : Arbre phylogénétique des mycoplasmes canins fondé sur le séquençage de<br>l'ARN ribosomal 16S. D'après Chalker et Brownlie (17). ....                                                              | 41 |
| Figure 6 : Arbre phylogénétique des mycoplasmes canins fondé sur le séquençage de<br>l'espace inter génique situé entre l'ARN ribosomal 16S et l'ARN ribosomal 23S.<br>D'après Chalker et Brownlie (17). .... | 43 |
| Figure 7 : Arbre phylogénétique regroupant divers mycoplasmes d'intérêt vétérinaire<br>et humain, fondé sur le séquençage de l'ARN ribosomal 16S. D'après Sirand-Pugnet<br><i>et al.</i> (82). ....           | 44 |
| Figure 8 : Relation entre l'hétérogénéité de coloration de colonies de mycoplasmes<br>et l'hypervariabilité antigénique. D'après Poumarat <i>et al.</i> (64). ....                                            | 52 |

### Tableaux

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Protocole de superimmunisation des lapins IOPS. D'après Bhogal <i>et al.</i> (10). ....                                                                              | 25 |
| Tableau 2 : Amorces PCR spécifiques utilisées pour l'identification de quelques canins et<br>conditions de réactions. D'après Chalker et Brownlie (17). ....                     | 33 |
| Tableau 3 : Liste des mycoplasmes canins identifiés par les techniques sérologiques,<br>caractéristiques biochimiques. D'après Chalker (16). ....                                | 37 |
| Tableau 4 : Liste des mycoplasmes humains identifiés par les techniques sérologiques,<br>caractéristiques biochimiques. D'après Rosenbusch (73). ....                            | 38 |
| Tableau 5 : Liste des mycoplasmes bovins identifiés par les techniques sérologiques,<br>caractéristiques biochimiques. D'après Ayling <i>et al.</i> (4) et Rosenbusch (73). .... | 39 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 6 : Diagnostic différentiel des troubles de la reproduction et des affections<br>néonatales provoqués par les mycoplasmes chez l'espèce bovine. D'après Bey (9) ..... | 78 |
| Tableau 7 : Ecart des CMI (mg/ml) de différents antibiotiques vis-à-vis des<br>mycoplasmes pathogènes pour l'homme. D'après Rodriguez <i>et al.</i> (68).....                 | 89 |
| Tableau 8 : Tables de prévision de la sensibilité des mycoplasmes envers les<br>antibiotiques in vivo en fonction de la CMI obtenue in vitro. D'après Hannan (36). .....      | 92 |

## **Annexes**

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Annexe 1 : Protocole d'obtention de la CMI pour une espèce de mycoplasme en milieu<br>solide. D'après Hannan (36). .....  | 113 |
| Annexe 2 : Protocole d'obtention de la CMI pour une espèce de mycoplasme en milieu<br>liquide. D'après Hannan (36). ..... | 115 |

# GLOSSAIRE

% : pour-cent(s)

µl : microlitre(s)

ADN : acide désoxyribonucléique

AGID : agar gel immunodiffusion test

ARN : acide ribonucléique

BVD : bovine virus disease

CHV : canine herpesvirus

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMM : concentration minimale mycoplasmicide

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

ccu (ou ucc) : color changing unit (ou unité de changement de couleur)

cfu (ou ufc) : colony forming unit (ou unité formant colonie)

cm : centimètre(s)

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

GIT : growth inhibition test ou test d'inhibition de croissance

IBR : rhinotrachéite infectieuse bovine

IOPS : indemne d'organismes pathogènes spécifiques

kg : kilogramme(s)

kpb : kilo(s) de paires de bases

LMPV : leucomalacie périventriculaire

MF dot : membrane filtration dot immunobinding

MIT : test d'inhibition métabolique

mg : milligramme(s)

min : minute(s)

ml : millilitre(s)

mm : millimètre(s)

N<sub>2</sub> : azote

nm : nanomètre(s)

nmol : nanomole(s)

OAT : oligo-asthéo-tératozoospermie

PCR : polymerase chain reaction (ou polymérisation en chaîne)

Pa : pascal(s)  
RFLP : restriction-fragment-length polymorphisms  
RSAT : test d'agglutination rapide sur lame  
SAH : système d'hypervariabilité antigénique  
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise  
SGG : sulfogalactoglycérolipide  
SGC : sulfogalactosylcéramide  
sec : seconde  
TAT : test d'agglutination en tube  
TNF : tumor necrosis factor  
TBS : tris buffered saline  
UNG : urétrite non gonococcique

# INTRODUCTION

Les mycoplasmes représentent une catégorie particulière de procaryotes dans la mesure où ils sont dépourvus de paroi. Ils forment la classe des Mollicutes. Le terme mycoplasme désigne l'ensemble de la classe des Mollicutes. Il ne doit pas être confondu avec le genre *Mycoplasma* qui ne désigne qu'une partie des mycoplasmes existants, tout comme le genre *Ureaplasma*.

La participation des mycoplasmes dans l'infertilité canine est mal connue en raison du petit nombre de publications dédiées à son étude. La documentation concernant la pathogénicité des mycoplasmes en reproduction humaine et bovine étant plus importante, il est nécessaire d'en prendre connaissance pour élaborer de nouvelles stratégies d'étude et de diagnostic.

Nous décrirons donc en premier lieu les caractéristiques des mycoplasmes, leurs conditions de croissance et les différentes méthodes d'identification pour mieux comprendre comment les classifications ont été établies et quelle est la relation entre les mycoplasmes et leurs hôtes respectifs. Dans une seconde partie, nous comparerons l'ensemble des données acquises sur la pathogénicité des mycoplasmes en reproduction humaine, bovine et canine.

Enfin, nous déterminerons comment diagnostiquer et traiter une infection liée aux mycoplasmes chez l'homme et le chien. Les motifs de suspicion clinique, le diagnostic différentiel et les modalités d'interprétation des prélèvements seront précisés.



# **I. Définition et classification des mycoplasmes hébergés chez les espèces canine, humaine et bovine**

## **A. Définition des mycoplasmes**

### **1. Caractères généraux des mycoplasmes**

Les mycoplasmes sont des bactéries incluses dans la classe des Mollicutes. Leur taxonomie sera décrite ultérieurement. Comme leur nom l'indique, ces bactéries sans paroi possèdent uniquement une membrane trilaminaire (49, 73).

#### **a) Taille et génome**

Ces bactéries sont aussi les plus petits procaryotes connus dont le diamètre égale en moyenne 300 nm (35), le maximum mesurant 800 nm chez certaines espèces (64).

Elles sont dotées d'un génome de petite taille, allant de 600 kpb (cas de *Mycoplasma genitalium*) à environ 1300 kpb, soit environ un sixième du génome de la bactérie *Escherichia coli* (11, 73, 79). Le pourcentage moléculaire en bases guanine et cytosine des genres *Ureaplasma* et *Mycoplasma* est faible et situé entre 23 et 40 %. Une partie seulement de leur génome est dédiée au codage de l'information génétique (73).

Le nombre de gènes est estimé à 700 environ (35, 76). Celui de *Mycoplasma genitalium*, mycoplasme au plus petit génome, correspond à environ 470 gènes (79).

## **b) Morphologie des colonies**

L'absence de paroi chez les mycoplasmes est à l'origine de leur plasticité de forme et de leur morphologie de type « œuf sur le plat » pour la plupart des colonies en croissance sur un milieu solide (64, 81).

Cette forme en œuf sur le plat correspond à un centre de croissance plus épais enchâssé dans le milieu solide, appelé le « cœur », avec en périphérie une croissance superficielle, d'aspect plus translucide (81).

## **2. Croissance des mycoplasmes**

### **a) Propriétés physiques et chimiques**

L'absence de paroi rigide rend les mycoplasmes fragiles, sensibles à la lyse par choc osmotique, à l'alcool, aux détergents et aux solvants organiques (64). Ce sont des bactéries qui ont longtemps été considérées comme instables, mourant rapidement en milieu liquide (56).

Toutefois, ces bactéries ont l'avantage de résister aux lysozymes et à l'action des antibiotiques inhibant la synthèse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne, tels que les pénicillines, les céphalosporines, les glycopeptides, la vancomycine, la bacitracine (35, 49, 68, 76). Elles sont également insensibles à la rifampicine, probablement en raison d'une faible affinité de la sous unité bêta de l'ARN polymérase pour cet antibiotique, à l'acide nalidixique et aux polymyxines, au chloramphénicol (9, 68).

Ainsi les principales familles d'antibiotiques utilisées contre les mycoplasmes en pratique sont les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés, et les tétracyclines.



## **b) Métabolisme et multiplication**

De la petite taille du génome des mycoplasmes résultent une capacité de synthèse limitée et une croissance dépendante de la composition de leur milieu. La plupart des espèces nécessitent par exemple acides gras et stéroïdes pour synthétiser leur membrane (64, 79).

Ces procaryotes sont dépourvus de la majorité des gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés et des cofacteurs d'enzyme : leur milieu doit donc aussi subvenir à leurs besoins en acides aminés et en vitamines (79).

L'oxygène n'est ni toxique, ni indispensable pour leur croissance : la majorité des mycoplasmes font partie des bactéries anaéro-aérobies facultatives (73). Ils se multiplient lentement, par fission binaire.

## **c) Conditions de résistance dans le milieu extérieur**

Les mycoplasmes ont aussi été décrits comme résistants si leur environnement est riche en protéines et humide, et capables de survivre quelques jours au réfrigérateur et plusieurs mois s'ils sont congelés à -20 °C (51). Ils sont d'ailleurs capables de supporter une vingtaine de cycles alternant congélation et décongélation (9). Des expériences récentes montrent que certaines espèces telles que *Mycoplasma bovis*, *Acholeplasma laidlawii* et *Mycoplasma arginini* résistent pendant 6 mois dans un milieu liquide à des températures variant entre 4 et 37 °C (56) et de façon plus surprenante, plusieurs mois à 4°C sur des disques de papier imprégnés de suspension de mycoplasmes. Après un an d'incubation, *Acholeplasma laidlawii* a été mis en évidence dans un échantillon de lait conservé à température ambiante.

Le genre *Ureaplasma*, contrairement aux autres mycoplasmes, semble doté d'une capacité de résistance face aux pressions osmotiques élevées. L'espèce *Ureaplasma diversum* a été isolée au sein d'urines de chat, milieu pourtant très concentré, et 50% des uréaplasmes humains résistent aux chocs osmotiques (9).

La capacité des mycoplasmes à persister sous diverses conditions environnementales gagnerait donc à être étudiée afin de connaître le risque des infections environnementales et de pouvoir les prévenir si elles sont démontrées (56).

## **B. Méthodes d'identification des mycoplasmes**

Aujourd'hui, plus de 180 espèces de mycoplasmes sont connues. La classification a été construite grâce à des critères génomiques mais aussi d'après des critères de croissance et des critères sérologiques, qui sont les premières méthodes ayant permis leur isolement et leur identification. De plus, la PCR (technique de polymérisation en chaîne) a permis de préciser les homologies et les différences de séquence entre les différentes espèces, d'où la création d'arbres phylogénétiques dans les dernières publications.

Ces méthodes n'ont pas seulement permis d'établir la taxinomie ou la parenté phylogénétique, elles ont aussi démontré la présence de mycoplasmes chez de nombreux animaux sains, où ces bactéries jouent le rôle de commensales.

### **1. Opérations préalables à l'identification des mycoplasmes**

#### **a) Transport et conservation des prélèvements**

Les principes de transport d'un prélèvement en vue de la recherche de mycoplasmes par culture découlent logiquement des conditions de croissance de ces procaryotes. Le transport doit être rapide, réfrigéré et l'échantillon placé dans un milieu humide (97).

Le milieu de transport pour une culture effectuée rapidement après la collecte peut être un milieu de Amie sans charbon ou un milieu de Stuart. Des milieux de culture plus spécifiques du genre de mycoplasme à rechercher peuvent être employés. Les prélèvements secs ne sont

pas recommandés. Si la culture doit être différée, il faut placer l'échantillon dans un congélateur à moins 70 °C ou dans de l'azote liquide (97).

#### **b) Purification des cultures**

Cette étape préalable est essentielle pour l'identification.

Les mycoplasmes traversent une membrane dont les pores mesurent 0,22 à 0,45 microns de diamètre, à la différence des autres bactéries (32). Il est recommandé de transférer les bactéries de l'échantillon dans un milieu liquide, de filtrer ce liquide à travers la membrane puis d'attendre la croissance des bactéries sur milieu solide. Après incubation, les clones obtenus subissent la même procédure deux fois de suite. La probabilité d'obtention d'une culture pure de *Mollicute* est ainsi très élevée (32).

#### **c) Observation des cellules et des colonies**

Les mycoplasmes observés en microscopie avec contraste de phase ou sur fond noir ont une forme très variable qui peut ressembler à celle des coques ou bien à des filaments fins agrégés.

L'observation et la reconnaissance des colonies sont facilitées par le fait qu'elles fixent le colorant de Dienes (bleu de méthylène mélangé à du bleu azur), à la différence de la plupart des autres bactéries, et par leur forme atypique en œuf sur le plat (32, 64, 81). Les colonies prennent alors un aspect bleuté (9, 32, 81).

La forme en œuf sur le plat est malgré tout sujette à des variations. Certaines colonies ont une croissance presque exclusivement en profondeur, limitée au « cœur », comme *Ureaplasma urealyticum*, d'autres exclusivement en surface (32, 81). En modifiant l'environnement d'*Ureaplasma urealyticum*, il est d'ailleurs possible de provoquer une croissance en surface qui mimerait l'aspect de colonies du genre *Mycoplasma* (81).

La forme en œuf sur le plat permet donc seulement de montrer les colonies de *Mollicutes*, la détermination du genre étant impossible à ce stade (16, 81).

## **2. Relation entre le milieu de culture et l'identification des mycoplasmes**

### **a) Critères biochimiques déterminant l'appartenance à une famille ou à un genre de mycoplasme**

Trois principaux genres de mycoplasmes interviennent en médecine vétérinaire : ce sont les genres *Mycoplasma*, *Ureaplasma* et *Acholeplasma*. La classification des mycoplasmes sera détaillée au sein d'un paragraphe ultérieur mais certains critères de croissance permettent de les différencier dès la mise en culture et sont à l'origine des premières méthodes d'identification de ces bactéries.

#### **(1) Capacité de croissance en présence de stérols**

La capacité de croissance en l'absence de stérols est présente chez les seules bactéries du genre *Acholeplasma* (32). Le principe du test est donc de mesurer la croissance du mycoplasme recherché dans des milieux de plus en plus concentrés en stérols.

Cependant, ce test est remplacé par un test plus rapide permettant de différencier les genres *Mycoplasma* et *Acholeplasma* : le test d'inhibition de croissance en présence de digitonine (32, 67).

#### **(2) Capacité de croissance en présence de digitonine**

La préparation du disque consiste à imbiber un disque de six mm de diamètre avec 0,025 ml d'une solution éthanolique de digitonine concentrée à 1,5 %. Le disque est ensuite mis à sécher à 37°C pendant une nuit. Stocké à une température comprise entre 4 et 10°C, il se conserve pendant plusieurs mois.

Le milieu de croissance choisi est solide et doit contenir 10 à 20% de sérum animal même si l'organisme identifié in fine est un *Acholeplasma*. Le disque imprégné de digitonine est alors posé sur ce milieu.

Le genre *Acholeplasma*, résistant à la digitonine, montre une croissance persistante jusqu'au bord du disque ou bien une zone d'inhibition limitée à un ou deux mm autour de sa périphérie (32).

Le genre *Mycoplasma* est sensible à la digitonine : on observera une zone d'inhibition de croissance mesurant quatre à cinq mm de large autour du disque (32).

### (3) Utilisation de l'urée

Le genre *Ureaplasma* synthétise une uréase, il est donc le seul capable de métaboliser l'urée. Sa croissance est directement liée à la concentration en urée du milieu : en son absence, aucune croissance n'est possible, et si l'on incorpore l'urée directement dans le bouillon de culture, la croissance sera optimale pour une concentration de  $5,6 * 10^3$  nmol/l (9).

Le pH et la composition du milieu seront identiques à ceux recommandés pour leur culture.

L'action de l'uréase se manifeste par l'alcalinisation du milieu, c'est pourquoi du rouge phénol est additionné au milieu utilisé. L'indicateur coloré vire du jaune au rose lorsque le pH du milieu augmente (9, 32, 67).

La mise en évidence de l'uréase est aujourd'hui facilitée par d'autres techniques colorimétriques utilisant les composés suivants : sulfate de manganèse, chlorure de manganèse, chlorure de calcium, chlorure de cobalt et acétate de cobalt. Rapides, exécutables à température ambiante, et plus spécifiques que le test utilisant le rouge de phénol, ces tests sont pratiqués en milieu solide (9, 68, 81).

Le chlorure de manganèse, ou bien le sulfate de manganèse, réagissent lors de la libération d'ammoniac en formant un précipité bronze à brun de dioxyde de manganèse (9, 81). Les colonies du genre *Ureaplasma* prennent alors un aspect brun foncé alors que les colonies du genre *Mycoplasma* restent bleues en présence du colorant de Dienes et de manganèse, ce qui présente un intérêt pour la diagnose des cultures mixtes (81).

Le second avantage de cette technique est la mise en évidence immédiate de bactéries du genre *Ureaplasma* à l'intérieur de cellules épithéliales hôtes ou bien à leur surface. L'inoculum n'a pas besoin d'être dépourvu de débris cellulaires ou de sédiments urinaires pour être transféré sur milieu gélosé, ce qui accélère la procédure en laboratoire (81).

Le sulfate de manganèse présente l'avantage de permettre, à plus petite concentration, et en présence de L-cystéine, une meilleure croissance des colonies, comparé au chlorure de manganèse (81).

#### **b) Critères biochimiques déterminant l'appartenance à une espèce de mycoplasme**

Les tests biochimiques suivants se sont avérés utiles pour classer de nombreuses espèces de mycoplasmes en sous groupes avant une identification définitive par des méthodes sérologiques, en l'absence des techniques d'amplification génétique (16). En effet, le nombre d'espèces possible, donc d'antisera à utiliser, se trouve réduit lorsque les trois critères biochimiques suivants sont connus : la capacité de fermentation du glucose, d'hydrolyse de l'arginine, et l'activité phosphatasique (16, 32).

##### **(1) Fermentation du glucose**

L'inoculum trois fois cloné est placé dans un bouillon proche du bouillon de culture modifié de Hayflick, dont le pH est ajusté à 7,4 et qui contient du glucose. Deux milieux de contrôle, l'un étant dénué d'inoculum et de glucose, l'autre dépourvu d'inoculum uniquement, sont préparés simultanément (32, 67).

Le sérum incorporé doit cependant être inactivé par la chaleur et le rouge de phénol tient lieu d'indicateur coloré (32, 67). La présence de pénicilline inhibe la croissance de bactéries opportunistes (9, 32). L'incubation est poursuivie pendant quatorze jours si nécessaire.

Dans le cas des mycoplasmes fermentant le glucose, le milieu s'acidifie et vire du rose au jaune (32, 67).

## (2) Hydrolyse de l'arginine

La procédure de fermentation du glucose est répétée mais cette fois, le pH est ajusté à 7,0 et le glucose est remplacé par de l'arginine. Sa consommation engendre l'alcalinisation du bouillon et par conséquent le virage du jaune vers le rouge de l'indicateur coloré (32).

Les souches métabolisant le glucose et l'arginine peuvent parfois poser un problème d'interprétation. Des variantes de la technique sont alors effectuées (32).

## (3) Activité phosphatasique

La technique consiste à alcaliniser le milieu gélosé inoculé et le milieu contrôle à 3 jours, puis à 5 et à 14 jours après incubation. L'indicateur coloré est cette fois-ci le diphosphate de phénolphthaléine. Cette molécule est incolore sous forme de diphosphate à pH basique. Elle vire au rouge lorsqu'elle se présente sous sa forme libre, sous l'action des phosphatases. Le test sera donc considéré comme positif lorsque la couleur rouge apparaît après adjonction de soude (32, 67).

## c) Milieux d'identification disponibles pour la culture des mycoplasmes

### (1) Choix de la consistance du milieu

La culture en présence d'un indicateur coloré comme le rouge de phénol est possible aussi bien sur un milieu solide que liquide, mais les tests utilisant le sulfate de manganèse se pratiquent en milieu solide (9, 68, 81). Il arrive cependant que des contaminations induisent des faux positifs pour le genre *Ureaplasma*. Dus à la présence d'une uréase provenant de cellules épithéliales, ils occasionnent un virage très rapide du milieu, et ne sont pas inhibés par la tylosine, antibiotique actif contre les mycoplasmes (9).

Le milieu de culture gélosé offre la possibilité d'observer les colonies et donc leur morphologie au microscope (9). Il sera utilisé pour étudier la concentration minimale inhibitrice d'un grand nombre de souches du genre *Mycoplasma*. La CMI ou concentration

minimale inhibitrice sera plus facile à évaluer en milieu liquide pour le genre *Ureaplasma* (68).

L'étude de la bactéricidie est effectuée en milieu liquide (68).

## (2) Choix de la composition du milieu

### (a) Culture du genre *Mycoplasma*

Le milieu incontournable pour la culture du genre *Mycoplasma* en milieu solide ou liquide est le milieu de Hayflick modifié. Les principaux composants spécifiques sont les extraits de levure, le sérum de cheval, le rouge phénol, l'acétate de thallium et la pénicilline (9, 67, 68).

Les extraits de levure fournissent des facteurs de croissance tels que les vitamines du groupe B, du magnésium et des précurseurs d'acides nucléiques. Cholestérol, glycérol et lipoprotéines sont apportés via le sérum de cheval (9, 51).

La pénicilline entrave la croissance de bactéries contaminantes issues du prélèvement (9, 51, 67).

Enfin, l'acétate de thallium constitue aussi un inhibiteur de croissance des autres bactéries.

Le pH du milieu de Hayflick s'échelonne entre 7,2 et 7,6 (68).

On y ajoute du glucose ou de l'arginine en fonction du type de mycoplasme à cultiver ou à rechercher (67, 68).



Figure 1 : Exemple de composition d'un bouillon de culture de type Hayflick modifié. D'après Rodriguez *et al.* (68).

| <b><u>Bouillon de culture de type modifié de Hayflick</u></b> |
|---------------------------------------------------------------|
| bouillon d'infusion de cœur : 17,5 g                          |
| Rouge de phénol à 1 pour mille : 20ml/l                       |
| Sérum de cheval : 200ml                                       |
| extrait frais de levure à 25 % : 100ml/l                      |
| (arginine ou glucose) selon espèce : 10g                      |
| acétate de thallium à 100 mg                                  |
| eau distillée qsp 1000ml                                      |
|                                                               |
| pH = 7,4 (7,2 à 7,6 en fonction de l'espèce)                  |

(b) Culture du genre *Ureaplasma*

Le milieu choisi pour la culture du genre *Ureaplasma* sera un milieu comparable au milieu de Shepard, pour lequel le pH est ajusté à 6,0 (9, 81). Plusieurs milieux de base peuvent servir pour la création d'un milieu adapté aux uréaplasmes : trypticase soy broth et ionagar, ou trypticase soy agar, ou PPLO agar, ou brain heart infusion et ionagar (81). Les milieux commerciaux disponibles sont par exemple les géloses A6D, A7, A7B, A8, les bouillons de culture U9 et 10B de Shepard (9, 12, 28, 68). Certains kits commerciaux sont dédiés à la recherche simultanée des genres *Ureaplasma* et *Mycoplasma* (12).

Les facteurs de croissance présents dans le milieu de Hayflick sont présents dans le milieu de Shepard, mais ce dernier comporte également de l'urée, de la L-cystéine, et du sulfate de manganèse pour les milieux gélosés (9, 68, 81).

Figure 2 : Exemple de composition d'un bouillon de culture de Shepard. D'après Rodriguez *et al.* (68).

| <b><u>Bouillon de culture de type Shepard</u></b> |
|---------------------------------------------------|
| Trypticase de soja : 24g                          |
| extrait frais de levure à 25% : 20 ml             |
| sérum de cheval : 200ml                           |
| L-cystéine : 100 mg                               |
| urée : 400mg                                      |
| eau distillée qsp 1000ml                          |
|                                                   |
|                                                   |
| pH ajusté à 6,0                                   |

### **3. Méthodes d'identification sérologiques des mycoplasmes**

Deux grands groupes de test sérologiques ont été créés pour identifier l'espèce d'un mycoplasme en laboratoire. Le premier groupe inclut une procédure de mise en évidence d'inhibition de croissance ou d'inhibition métabolique à l'aide d'anticorps spécifiques d'espèce. Le second groupe met en évidence la liaison entre un antigène et un anticorps spécifique : il s'agit de l'immunofluorescence et de l'utilisation des immunopéroxydases (16, 32).

#### **a) Préparation d'un antisérum spécifique de l'espèce recherchée**

La fabrication d'un test sérologique sensible et spécifique pour la détection de chaque espèce de mycoplasme nécessite l'élimination de la production d'anticorps dirigés contre les composants des milieux de culture chez les animaux superimmunisés.

De multiples purifications par lavages successifs ne suffisent pas car les composants tels que le sérum d'origine animale et les extraits de levure restent adsorbés à la membrane mycoplasmaïque durant la centrifugation. De plus la production de milieux non antigéniques s'est révélée inefficace (10).

Néanmoins, un protocole permet d'obtenir des lapins immunotolérants aux composants du milieu de culture des mycoplasmes et superimmunisés contre une de leur espèce. Ce protocole a été validé en 1987 par l'équipe de BHOGAL pour la production d'anticorps spécifiques dirigés contre *Mycoplasma hyopneumoniae* et *Mycoplasma hyorhinis* (10).

- Description du protocole

La première étape conduit à l'obtention de lapins immunotolérants à l'âge de huit semaines. Ensuite, ceux-ci sont sevrés : c'est alors le début de la phase de superimmunisation qui dure deux mois.

Les antigènes utilisés étaient *Mycoplasma hyopneumoniae* strain JF 1627 et *Mycoplasma hyorhinis* strain JF 1629. Après multiplication dans le milieu liquide de Friis à 37°C puis congélation, la concentration des cultures obtenues était comprise entre 10<sup>5</sup> colour changing unit/ml et 10<sup>6</sup> colour changing unit/ml. Le protocole est détaillé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Protocole de superimmunisation des lapins IOPS. D'après Bhogal *et al.* (10).

| <u>jour de la manipulation</u>   | <u>étape du protocole effectuée</u>                                                                                                                    |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| jour 0 (naissance)               | injection intrapéritonéale de 0,25 ml du milieu liquide de Friis contenant 40% de sérum de porc inactivé par la chaleur (appelée substance tolérogène) |
| jours 1 à 10                     | injection intrapéritonéale quotidienne de 0,5 ml de substance tolérogène                                                                               |
| jours 11 à 56 (8 semaines d'âge) | injection intrapéritonéale de 0,5 ml de substance tolérogène un jour sur deux                                                                          |
| Jour 56                          | sevrage des lapereaux                                                                                                                                  |
| jours 63, 64 et 65               | injection intramusculaire de 1 ml d'antigène émulsionné avec 1ml d'adjuvant complet de Freund                                                          |
| jours 66, 67 et 68               | injection intrapéritonéale de 1,5 ml de l'antigène émulsionné par l'adjuvant complet de Freund                                                         |
| jour 110                         | injection intramusculaire de 1,5 ml d'antigène émulsionné                                                                                              |
| jour 117                         | saignée des lapins, traitement des sérums par la chaleur, filtration et stockage à -20 °C                                                              |

- Efficacité du protocole

A la différence des protocoles précédents où les composants du milieu étaient injectés uniquement pendant les dix premiers jours d'existence, ce protocole a prouvé son efficacité grâce à des tests de précipitation lors d'immunodiffusion sur gel d'agarose.

L'immunotolérance est complète car on constate l'absence de ligne de précipité lors de ces tests entre le milieu liquide de Friis et les sérums de lapins immunotolérants superimmunisés contre *Mycoplasma hyorhinis* et *Mycoplasma hyopneumoniae*. Cette tolérance induite persiste pendant six mois après la dernière étape de l'immunisation (10).

La spécificité est complète : on obtient une ligne unique de précipité entre un antigène et un sérum de lapin superimmunisé à l'aide de cet antigène. Il n'y a aucune ligne de précipité entre ce sérum et un antigène hétérologue (10).

#### **b) Principe et interprétation du test d'inhibition de croissance**

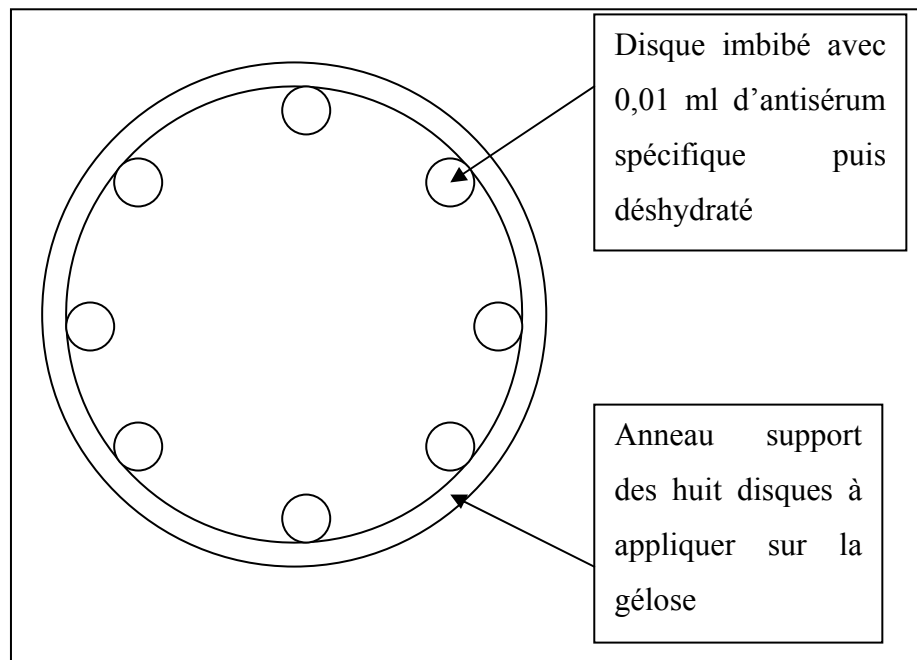
Le test d'inhibition de croissance ou GIT (growth inhibition test) a été progressivement amélioré dans les années 1960. Le matériel nécessaire comporte un microscope, des disques de papier déshydratés imbibés d'antisérum spécifique d'espèce, un milieu de croissance adapté aux mycoplasmes, en plus de l'inoculum préalablement cloné de  $10^4$  à  $10^5$  cfu/ml (19, 32, 87).

Le principe est simple : le disque de 6 mm imbibé par 0,025 ml d'antisérum est soumis à la dessiccation puis est placé sur le milieu gélosé inoculé. Si le sérum est homologue de l'espèce de mycoplasme inoculée, une zone d'inhibition de croissance de 3 à 7 mm va se former autour du disque (19, 32, 87).

Les premiers antiséras « spécifiques » obtenus par superimmunisation ne respectaient pas le protocole rigoureux décrit précédemment : les animaux étaient des adultes sur lesquels la première injection comportait l'antigène et l'adjuvant de Freund (19, 87).

Le nombre d'antisera testés au sein d'une même gélose peut être multiplié en utilisant un anneau de papier reliant 8 disques correspondant à 8 sera différents (figure 3). Le nombre de géloses total et la quantité de sérum sur chaque disque sont économisés. Cette méthode créée par STANBRIDGE et HAYFLICK en 1967 s'est révélée posséder la même spécificité que les disques individuels (87).

Figure 3 : Dessin d'un anneau support du test d'inhibition de croissance



Le test d'inhibition de croissance est plus spécifique que les tests d'immunodiffusion double et d'immunoélectrophorèse en deux dimensions. Pour conserver une bonne sensibilité, l'antisérum ne doit pas être dilué (32).

Certaines réactions croisées entre des espèces proches génétiquement sont toutefois répertoriées, notamment entre *Mycoplasma canis* et *Mycoplasma edwardii*, entre *Mycoplasma bovis* et la souche HRC 689, et entre HRC 689 et certaines sous espèces de *Mycoplasma mycoides* (16, 74, 84).

#### **c) Principe et interprétation du test d'inhibition métabolique**

Ce test repose sur l'utilisation des indicateurs colorés décrite précédemment, et sur les capacités de fermentation de l'espèce préalablement déterminées. En présence d'un antisérum homologue, le virage colorimétrique n'a plus lieu et l'espèce est alors identifiée (9, 32).

Ce test est doté d'une meilleure sensibilité que le GIT (9, 32), sa spécificité étant décrite comme voisine de celle du GIT (32).

#### **d) Principe et interprétation du test utilisant l'immunofluorescence**

L'immunofluorescence est aussi spécifique que les tests d'inhibition de croissance et d'inhibition métabolique, et aussi sensible que le test d'inhibition métabolique. L'intérêt principal de cette technique réside en la détection de mycoplasmes directement au sein de biopsie, de cultures cellulaires, ou lorsque la croissance est fastidieuse (2, 8, 32). L'étape du clonage n'est donc plus requise.

L'immunofluorescence sera qualifiée de directe si le fluorochrome est couplé aux anticorps anti-mycoplasmes issus de lapin superimmunisés (2, 8, 32). Elle sera indirecte si le fluorochrome est couplé à un anticorps anti-globuline de lapin (32).

Il existe plusieurs types de fluorochromes dont l'isothiocyanate de tetraméthylrhodamine et l'isothiocyanate de fluorescéine. Les teintes de fluorescence respectives de ces deux molécules sont le rouge et le vert, d'où l'utilisation possible de deux anticorps distincts au sein de chaque boîte de Pétri simultanément (8).

#### **e) Principe et interprétation du test utilisant les immunoperoxydases**

La technique s'applique sur le même type d'échantillon que pour l'immunofluorescence. En couplant une peroxydase à un anticorps spécifique de mycoplasmes, on rajoute une recherche

d'espèce supplémentaire à celles effectuées par deux fluorochromes (8). Les cultures mixtes n'ont plus besoin d'être isolées avant identification.

Grâce à la combinaison de l'immunofluorescence et de l'immunoperoxydase, BENCINA et BRADBURY ont pu rechercher trois espèces de mycoplasmes au sein d'un même spécimen (8). Il a par ailleurs montré que la proportion des colonies de *M. gallinarum* était beaucoup plus importante que celles de *M. gallisepticum* et de *M. synoviae* dans l'oviducte et la trachée de 8 poules infectées naturellement (8).

#### **f) Principe et interprétation de la technique utilisant la MF dot**

- Principe de la technique

La technique intitulée MF dot (Membrane Filtration dot immunobinding) est fondée sur l'utilisation de microplaques contenant 96 puits. Le fond des puits est constitué par une membrane poreuse. La taille des pores mesure 0,22 microns, ce qui autorise une filtration des puits après le dépôt de chaque agent réactif, à l'aide d'une pompe à vide (63, 79). Les réactions liées aux composants de milieu sont ainsi minimisées, ce qui permet d'augmenter la spécificité d'un test sérologique (63). Si la bactérie recherchée appartient au genre *Ureaplasma*, la taille des pores employés sera réduite à 0,1 micron, en raison de la petite taille de ces bactéries (9).

- Description de la méthode

Deux à trois heures sont nécessaires pour achever le test. La séquence des étapes est la suivante :

##### -Préparation de la microplaque

La microplaque est rincée avec une solution tampon TBS (Tris buffered saline) contenant 0,05 % de Tween 20. Le vide appliqué, entre -40 et -60 Pa, induit la dispersion de cette solution. La même opération est ensuite réalisée avec une solution TBS seule.

##### -Dépôt de l'espèce de mycoplasme inconnue puis blocage

200 µl de mycoplasmes cultivés en milieu liquide sont déposés dans chaque puits. Le milieu de culture n'est pas dilué sauf si la turbidité est trop importante. Il est ensuite aspiré. 200 µl de

la solution de blocage (TBS contenant 10 % de sérum de cheval) sont introduits dans chaque puits. Le tout incube en agitation lente pendant 30 minutes. Le puits est ensuite filtré comme précédemment.

-Dépôt des anticorps spécifiques issus de lapins superimmunisés.

200 µl sont ajoutés dans chaque puits. L'incubation dure 45 minutes.

-Lavages

Trois lavages suivis chacun par une filtration sont effectués à l'aide de la solution TBS et Tween. Un lavage avec une solution de TBS suivi par une filtration conclut cette séquence.

-Dépôt de l'anticorps anti-espèce de lapin couplé à une peroxydase

200 µl de ce réactif sont déposés dans chaque puits et incubent pendant trente minutes.

-Lavages

Le puits est rincé selon la même méthode utilisée après le dépôt du sérum.

-Réaction immunoenzymatique

La solution révélatrice est une solution TBS contenant 0,5 % w/v de tétrahydrochloride 3,3' diaminobenzine et 0,1 % d'eau oxygénée. 200 µl de cette solution sont déposés au fond du puits. Une première lecture a lieu une minute après : l'apparition d'une coloration rouge signe une réaction positive. La plaque est alors rincée sans filtration avec de l'eau distillée puis l'intensité de la coloration est reportée. Elle peut être qualifiée de douteuse (-), faible (+), moyenne (++), forte (+++).

- Applications

L'expérience menée par l'équipe de POUMARAT *et al.* visait à mettre en évidence la présence ou l'absence de réactions croisées entre 18 espèces différentes de mycoplasmes, l'espèce *M. mycoides* étant représentée par trois sous espèces : *M. mycoides subsp. capri*, *M. mycoides subsp. mycoides SC*, *M. mycoides subsp. mycoides LC* (63).



Parmi les 18 espèces testées, cinq ont été répertoriées chez le chien : *A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. alkalescens*, *M. bovis*, *M. bovigenitalium*. Aucune réaction croisée n'a été constatée entre ces cinq espèces.

Seuls les couples d'espèces *M. bovis* et *M. agalactiae* d'une part, et *M. mycoides* et *M. capricolum* d'autre part, ont été à l'origine de réactions croisées, tout comme les sous espèces de *M. mycoides*, lorsque la MF dot est utilisée de façon qualitative.

Cette spécificité est alors voisine de celle des tests d'inhibition métabolique ou utilisant l'immunoperoxydase.

Utilisée selon une méthode quantitative, la MF dot permet de différencier *M. mycoides* et *M. capricolum*, la spécificité de la technique augmente alors.

Comparée aux méthodes sérologiques citées précédemment, la MF dot présente les avantages suivants : les résultats sont obtenus en deux à trois heures, les espèces à tester peuvent émaner de cultures aussi bien anciennes que fraîches, et la quantité de sérum hyper immun nécessaire est plus faible. De plus, de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément (63).

Outre la mise en évidence de réactions croisées, la MF dot autorise le dénombrement des mycoplasmes. Huit dilutions décimales sont réalisées à partir de l'inoculum initial une fois l'espèce de mycoplasme identifiée avec certitude (51). Chaque dilution estensemencée dans cinq cupules de la microplaque en associant dans chacune des cupules 20 µl de la dilution à tester et 180 µl de milieu.

Une formule mathématique permet alors de calculer la densité Z de l'inoculum avec  $Z = Y * 1/20 * 10^{-(x+3)}$ . -x est la dernière dilution pour lesquelles les cinq cupules ont poussé, Y équivaut à 5ab, avec a nombre de cupules positives à la dilution  $10^{-(x+1)}$  et b le nombre de cupules positives à la dilution  $10^{-(x+2)}$  (51).

Cette technique a notamment permis de dénombrer *Mycoplasma canis* chez deux groupes de chiennes composés par un groupe témoin de chiennes en bonne santé et un groupe de

chiennes ayant présenté des troubles de la fertilité imputables aux mycoplasmes. Le faible nombre de cas de cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les deux groupes même si des concentrations de *Mycoplasma canis* supérieures à  $10^6$  ufc/ml ont seulement été observées chez les chiennes présentant des troubles de la reproduction (51).

#### **4. Spéciation à l'aide du génie génétique**

##### **a) Polymérisation en chaîne ou PCR**

La PCR ou technique de polymérisation en chaîne permet aujourd'hui l'identification des différentes espèces de mycoplasmes d'intérêt vétérinaire. Elle est fondée sur l'amplification de séquences d'ADN grâce à la Taq polymérase et à des amorces spécifiques, aussi appelées primers (17). Une trentaine de cycles se succède avant l'analyse de la séquence. La séquence est ensuite décryptée à l'aide de logiciels informatiques.

Cette technique a été en premier lieu appliquée au séquençage de l'ARN ribosomal 16 S des espèces de mycoplasmes (17), puis à l'espace intergénique situé entre la séquence codant l'ARN ribosomal 16 S et la séquence codant l'ARN ribosomal 23 S chez les mycoplasmes d'intérêt vétérinaire (17).

Le tableau 2 détaille les spécificités de la recherche par PCR des espèces de mycoplasmes associées à l'espèce canine. La séquence de la première amorce utilisée est commune à ces espèces : CCGCCCGTCACACCA. La séquence de la seconde amorce est plus spécifique et indiquée dans ce même tableau. Des techniques complémentaires comme l'utilisation d'enzyme de restriction s'avèrent parfois nécessaires lorsque les amorces utilisées et la taille des amplicons sont identiques pour plusieurs espèces, ce qui est le cas dans l'expérience menée par CHALKER et BROWNLIE (17).

Tableau 2 : Amorces PCR spécifiques utilisées pour l'identification de quelques mycoplasmes canins et conditions de réactions. D'après Chalker et Brownlie (17).

| <u>espèce</u>            | <u>séquence de l'amorce spécifique</u> | <u>conditions du cycle</u>                     | <u>taille de l'amplicon (pb)</u> |
|--------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>M. arginini</i>       | GTTGTATGACCTATTGTTGTC                  | 95 °C 1min, 50°C<br>30 sec, 72 °C 1min         | 312                              |
| <i>M. canis</i>          | CTGTCGGGGTTATCTCGAC                    | 95 °C 1min, 55 °C<br>30 sec, 72 °C 1min        | 247                              |
| <i>M. cynos</i>          | GATACATAAACACAACATTATAATATTG           | 95 °C 45 sec, 55 °C<br>30 sec, 72 °C 20<br>sec | 227                              |
| <i>M. edwardii</i>       | CTGTCGGGGTTATCATGCGAC                  | 95 °C 45 sec, 55 °C<br>30 sec, 72 °C 20<br>sec | 250                              |
| <i>M. felis</i>          | GGACTATTATCAAAAGCACATAAC               | 95 °C 45 sec, 51 °C<br>30 sec, 72 °C 20<br>sec | 238                              |
| <i>M. gateae</i>         | GTTGTATGACCTATTGTTGTC                  | 95 °C 1min, 50°C<br>30 sec, 72 °C 1min         | 312                              |
| <i>M. maculosum</i>      | CCTATGATTGTTACGATG                     | 95 °C 1min, 50°C<br>30 sec, 72 °C 1min         | 432                              |
| <i>M. molare</i>         | AGCCTATTGTTTTGATTTG                    | 95 °C 1min, 55 °C<br>30 sec, 72 °C 1min        | 397                              |
| <i>M. opalescens</i>     | TAAGCTTTGTAGACCATAA                    | 95 °C 1min, 50°C<br>30 sec, 72 °C 1min         | 236                              |
| <i>M. spumans</i>        | GTTGTATGACCTATTGTTGTC                  | 95 °C 1min, 50°C<br>30 sec, 72 °C 1min         | 312                              |
| <i>M. sp.</i> HRC<br>689 | CTTGCGACCTAACAAGTCC                    | 95 °C 45 sec, 51 °C<br>30 sec, 72 °C 20<br>sec | 227                              |

#### **b) Hybridation *in situ* à l'aide de sondes ribonucléiques**

L'hybridation *in situ* à l'aide de sondes ribonucléiques spécifiques de mycoplasmes a été décrite pour la première fois en 2004 (18). Les tissus préalablement fixés par le formol sont inclus dans de la paraffine. Un traitement enzymatique par la protéinase K expose l'ARN de l'échantillon aux réactifs, puis la sonde ribonucléique est ajoutée. Après deux heures d'hybridation, une réaction colorimétrique met en évidence la fixation de la sonde. Les mycoplasmes apparaissent teintés de noir.

L'hybridation *in situ* possède l'avantage de préciser les types de cellules infectées tel que l'épithélium trachéal. Elle est malgré tout moins sensible que la PCR (18).

### c) Association PCR-RFLP

L'identification rapide d'une espèce de mycoplasme par la PCR seule n'est pas envisageable dans la mesure où de multiples cycles de PCR en série sont nécessaires pour la recherche de chaque espèce. Une méthode associant PCR et RFLP (restriction-fragment-length polymorphisms) a été testée sur douze espèces de mycoplasmes canins de référence et sur des isolats recueillis sur le terrain. Les résultats d'identification obtenus ont été comparés à ceux obtenus à l'aide des méthodes sérologiques traditionnelles (84).

Les douze espèces de mycoplasmes de référence choisies appartiennent au genre *Mycoplasma* et ne sont pas hémotropiques. Il s'agit des espèces suivantes : *M. bovis genitalium* PG11, *M. cynos* H831, *M. edwardii* PG24, *M. felimutuum* Ben, *M. felis* CO, *M. gateae* C5, *M. maculosum* PG15, *M. molare* H542, *M. opalescens* MH5408D, *M. spumans* PG13, *M. arginini* G 230 NCTC10129, *M. canis* PG14 NCTC10146.

A l'aide d'un cycle de PCR et d'une digestion par deux enzymes de restriction, douze profils de bande différents ont été obtenus pour les douze espèces de référence. Deux couples d'enzymes de restriction ont été utilisés à cet effet : TaqI et VspI d'une part, ApoI et DdeI de l'autre.

Parmi les 262 isolats testés, 95,8 % sont associés à la même espèce à l'aide des méthodes PCR-RFLP et sérologiques.

Cependant, cette technique a permis de mettre en évidence l'existence de réactions croisées sérologiques. Onze isolats de la souche *Mycoplasma sp.* HCR 689, identifiés grâce au séquençage par PCR du gène codant l'ARN ribosomal 16 S, avaient été définis comme appartenant à *M. bovis genitalium* par la méthode sérologique et sans correspondance avec les espèces de référence par la technique associant RFLP et PCR.

De plus, 24 cultures pures de *M. edwardii* et de *M. canis* ont été analysées comme mixtes par les méthodes sérologiques alors que le séquençage par PCR de l'ARN ribosomal 16 S et la technique RFLP-PCR ont montré la présence d'une espèce unique.

Cette nouvelle technique associant PCR et RFLP, plus rapide et moins coûteuse que la PCR seule, semble ainsi plus spécifique que les méthodes sérologiques. Elle pourrait être appliquée aux isolats mis en culture et purifiés. Aucune culture mixte n'a été mise en évidence par cette technique. Sa sensibilité et sa spécificité restent à étudier avant une application à des cultures primaires provenant d'échantillons recueillis sur le terrain (84).

## **C. Classification des mycoplasmes**

### **1. Classification des genres de mycoplasmes**

Les trois taxons déterminant l'ordre, la famille et le genre d'un mycoplasme ont été établis sur les critères suivants : habitat, présence obligatoire ou non de stérols pour la croissance, taille du génome, tolérance à l'oxygène et synthèse d'une uréase. Ce dernier critère est la propriété du seul genre *Ureaplasma*.

La figure 4 retrace les différences entre les genres de mycoplasmes, dont certains seulement ont une importance vétérinaire (73).

Certaines espèces appartenant anciennement aux genres *Eperythrozoon* et *Haemobartonella* sont dépourvues de paroi et possèdent une séquence génétique très proche des bactéries du genre *Mycoplasma* (26). Actuellement, les taxons *Eperythrozoon* et *Haemobartonella* sont *incertae sedis*. La désignation *Candidatus* précède le nom des espèces dont le statut est incertain avant le transfert au sein du genre *Mycoplasma* (26).

Figure 4 : Classification simplifiée des genres de mycoplasmes. D'après Euzéby (26) et Rosenbusch (73).

|                                                                                                                                                                                                                                                             | <u>Taille du génome</u>                                        | <u>% moléculaire<br/>en G et C</u>              | <u>Habitat</u>                                                                | <u>Dépendance en<br/>cholestérol ?</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <u>Ordre 1</u><br><u>Mycoplasmatales</u><br><u>Famille 1</u><br><u>Mycoplasmataceae</u><br><br>Genre 1 : <i>Mycoplasma</i><br><br>Genre 2 : <i>Ureaplasma</i>                                                                                               | 600 à 1350 kpb<br><br><br><br>760 à 1170 kpb                   | 23 à 40 %<br><br><br><br>27 à 30 %              | Homme, animaux<br>supérieurs<br><br><br>Homme, animaux<br>supérieurs          | oui<br><br><br><br>oui                 |
| <u>Ordre 2</u><br><u>Entomoplasmatales</u><br><u>Famille 1</u><br><u>Entomoplasmataceae</u><br><br>Genre 1 : <i>Entomoplasma</i><br><br>Genre 2 : <i>Mesoplasma</i><br><br><u>Famille 2</u><br><u>Spiroplasmataceae</u><br><br>Genre 1 : <i>Spiroplasma</i> | 790 à 1140 kpb<br><br>870 à 1100 kpb<br><br><br>940 à 2200 kpb | 27 à 29 %<br><br>27 à 30 %<br><br><br>25 à 30 % | Insectes et plantes<br><br>Insectes et plantes<br><br><br>Insectes et plantes | oui<br><br>non<br><br><br>oui          |
| <u>Ordre 3</u><br><u>Acholeplasmatales</u><br><u>Famille 1</u><br><u>Acholeplasmataceae</u><br><br>Genre 1 : <i>Acholeplasma</i>                                                                                                                            | 1500 à 1650 kpb                                                | 26 à 36 %                                       | Animaux, plantes,<br>insectes                                                 | non                                    |
| <u>Ordre 4</u><br><u>Anaeroplasmatales</u><br><u>Famille 1</u><br><u>Anaeroplasmataceae</u><br><br>Genre 1 : <i>Anaeroplasma</i><br><br>Genre 2 : <i>Asteroleplasma</i>                                                                                     | 1500 à 1600 kpb<br><br>1500 kpb                                | 29 à 34 %<br><br>40%                            | Rumen bovin ou ovin<br><br>Rumen bovin ou ovin                                | oui<br><br>non                         |

## **2. Classification obtenues à l'aide des cultures et des méthodes sérologiques**

Les classifications présentées aux tableaux 3, 4 et 5 montrent l'étendue des espèces de mycoplasmes rapportées chez l'homme en 1994, chez les bovins en 2000, et chez l'espèce canine en 2005 (4, 16, 73).

### **a) Chez le chien**

La combinaison des tests de fermentation du glucose, d'hydrolyse de l'arginine et des diphosphates est insuffisante pour la spéciation mais elle réduit le nombre d'antisera à tester (16).

Les espèces *Mycoplasma haemocanis* et *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* ne sont pas listées dans le tableau 3 car elle n'ont jamais été isolées en culture : ces deux espèces hémotropiques restent décelables par PCR (16, 17, 96).

Tableau 3 : Liste des mycoplasmes canins identifiés par les techniques sérologiques, caractéristiques biochimiques. D'après Chalker (16).

| Espèce                               | temps de croissance en milieu gélosé à 37°C (jours) | fermentation du glucose | Hydrolyse de l'arginine | Activité phosphatasique |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Acholeplasma laidlawii</i>        | 2                                                   | +                       | -                       | -                       |
| <i>Mycoplasma arginini</i>           | 1                                                   | -                       | +                       | -                       |
| <i>Mycoplasma bovigenitalium</i>     | 2                                                   | -                       | -                       | +                       |
| <i>Mycoplasma canis</i>              | 2                                                   | +                       | -                       | -                       |
| <i>Mycoplasma cynos</i>              | 1                                                   | +                       | -                       | +                       |
| <i>Mycoplasma edwardii</i>           | 2                                                   | +                       | -                       | -                       |
| <i>Mycoplasma felimutum</i>          | 1                                                   | +                       | -                       | -                       |
| <i>Mycoplasma felis</i>              | 2                                                   | +                       | -                       | +                       |
| <i>Mycoplasma gateae</i>             | 2                                                   | -                       | +                       | -                       |
| <i>Mycoplasma maculosum</i>          | 2                                                   | -                       | +                       | +                       |
| <i>Mycoplasma molare</i>             | 1                                                   | +                       | -                       | -                       |
| <i>Mycoplasma opalescens</i>         | 2                                                   | -                       | +                       | +                       |
| <i>Mycoplasma spumans</i>            | 2                                                   | -                       | +                       | +                       |
| <i>Mycoplasma sp. strain HRC 689</i> | 2                                                   | +                       | -                       | +                       |
| <i>Mycoplasma sp. strain VJC 358</i> | 3 à 5                                               | +                       | -                       | ND                      |
| <i>Ureaplasma canigenitalium</i>     | 2                                                   | -                       | -                       | -                       |

### **b) Chez l'homme**

Le tableau 4 présente les 14 espèces de mycoplasmes répertoriés chez l'homme à l'aide des méthodes sérologiques en 1994. On distingue aujourd'hui deux biovars distincts d'*Ureaplasma urealyticum* par PCR : *Ureaplasma parvum* et *Ureaplasma urealyticum*. Ceci porte à 15 le nombre actuel d'espèces présentes chez l'humain.

Tableau 4 : Liste des mycoplasmes humains identifiés par les techniques sérologiques, caractéristiques biochimiques. D'après Rosenbusch (73).

| Espèce                           | fermentation<br>du glucose | Hydrolyse de<br>l'arginine |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Acholeplasma laidlawii</i>    | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma buccale</i>        | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma faucium</i>        | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma fermentans</i>     | +                          | +                          |
| <i>Mycoplasma genitalium</i>     | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma hominis</i>        | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma lipophilum</i>     | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma orale</i>          | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma penetrans</i>      | +                          | +                          |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>     | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma primatum</i>       | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma salivarium</i>     | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma spermatophilum</i> | -                          | +                          |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i>    | -                          | -                          |

### **c) Chez les bovins**

On dénombre 27 espèces de mycoplasmes ayant pour hôte l'espèce bovine, dont deux appartiennent au genre *Anaeroplasma* (tableau 5).

*Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovirhinis* et *Acholeplasma laidlawii* sont les espèces les plus fréquemment identifiées en Grande Bretagne. Elles représentent respectivement 52 %, 28 % et 8 % des isolats recueillis au sein des tractus urogénital et respiratoire, de l'appareil oculaire et lors de mammite (4).



*Mycoplasma bovis* génère des mammites cliniques et subcliniques chroniques (15, 29). L'agent pathogène occasionne des infections chroniques difficiles à éradiquer et persiste pendant les périodes de tarissement (15). L'infection se transmet le plus souvent par l'intermédiaire du matériel de traite (29).

Tableau 5 : Liste des mycoplasmes bovins identifiés par les techniques sérologiques, caractéristiques biochimiques. D'après Ayling *et al.* (4) et Rosenbusch (73).

| Espèce                                     | fermentation<br>du glucose | Hydrolyse<br>de l'arginine |
|--------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Acholeplasma axanthum</i>               | +                          | -                          |
| <i>Acholeplasma granularum</i>             | +                          | -                          |
| <i>Acholeplasma laidlawii</i>              | +                          | -                          |
| <i>Acholeplasma modicum</i>                | +                          | -                          |
| <i>Acholeplasma oculi</i>                  | +                          | -                          |
| <i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>        | +                          | -                          |
| <i>Anaeroplasma bactoclasticum</i>         | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma alkalescens</i>              | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma alvi</i>                     | +                          | +                          |
| <i>Mycoplasma arginini</i>                 | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma bovirgenitalium</i>          | -                          | -                          |
| <i>Mycoplasma bovirhinis</i>               | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma bovis</i>                    | -                          | -                          |
| <i>Mycoplasma bovoculi</i>                 | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma californicum</i>             | -                          | -                          |
| <i>Mycoplasma canadense</i>                | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma canis</i>                    | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma capriculum</i>               | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma conjonctivæ</i>              | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma dispar</i>                   | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma equirhinis</i>               | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma gallinarum</i>               | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma gallisepticum</i>            | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma gateae</i>                   | -                          | +                          |
| <i>Mycoplasma mycoides subsp. mycoides</i> | +                          | -                          |
| <i>Mycoplasma verecundum</i>               | -                          | -                          |
| <i>Ureaplasma diversum</i>                 | -                          | -                          |

### **3. Classifications obtenues à l'aide du génie génétique**

#### **a) Chez le chien**

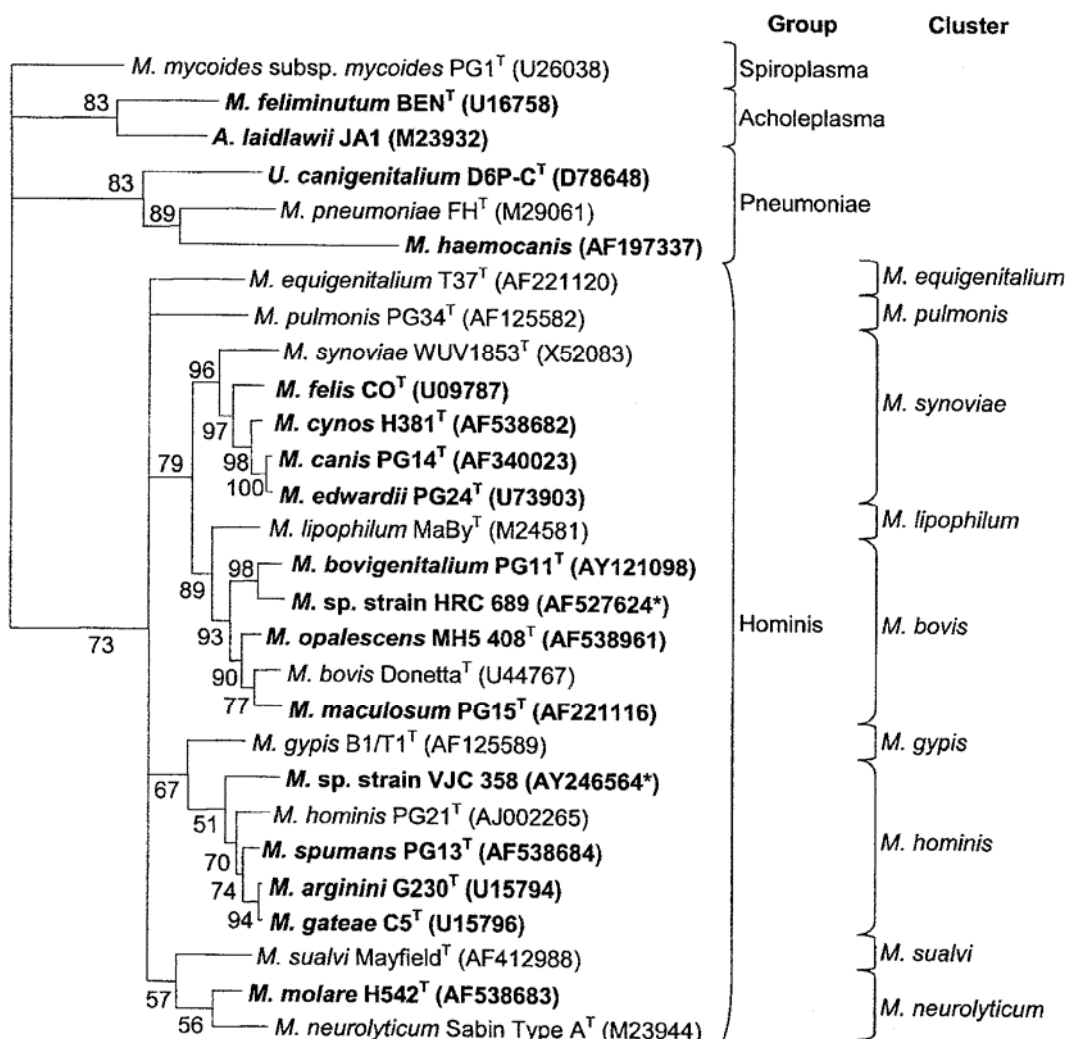
##### **(1) Par séquençage de l'ARN ribosomal 16S**

On répertorie seize espèces de mycoplasmes reconnues ainsi que les deux souches VJC 358 et HRC 689 au sein de l'espèce canine (16, 17, 96).

La comparaison des séquences codant l'ARN ribosomal 16S a permis la création d'un arbre phylogénétique : les mycoplasmes « canins » et d'autres mycoplasmes d'intérêt vétérinaire sont d'autant plus proches que leurs séquences sont homologues (17). Sur la figure 5, les mycoplasmes « canins » sont désignés en gras et le pourcentage d'homologie de séquence génétique entre deux espèces est précisé à chaque embranchement (17).

*Candidatus Mycoplasma haematoparvum* n'est pas mentionnée sur cette figure car cette espèce n'a été découverte qu'en 2004 par SYKES d'après WENGI *et al.* (96). Ce mycoplasme est environ cent fois moins concentré que *Mycoplasma haemocanis* dans le sang de chiens infectés et sa détection par PCR n'est possible que depuis 2006 (96).

**Figure 5** : Arbre phylogénétique des mycoplasmes canins fondé sur le séquençage de l'ARN ribosomal 16S. D'après Chalker et Brownlie (17).



Dorénavant, les mycoplasmes canins et les autres mycoplasmes vétérinaires sont répartis en quatre groupes : Spiroplasma, Acholeplasma, Pneumoniae et Hominis. Le groupe Hominis est lui-même subdivisé en huit clusters : *M. equigenitalium*, *M. pulmonis*, *M. synoviae*, *M. lipophilum*, *M. bovis*, *M. gypis*, *M. hominis*, *M. suis* et *M. neurolyticum* (17).

On remarque que tous les Mollicutes du genre *Mycoplasma* répertoriés chez le chien appartiennent tous au groupe Hominis, à l'exception de *M. feliminutum* et *M. haemocanis* (figure 5).

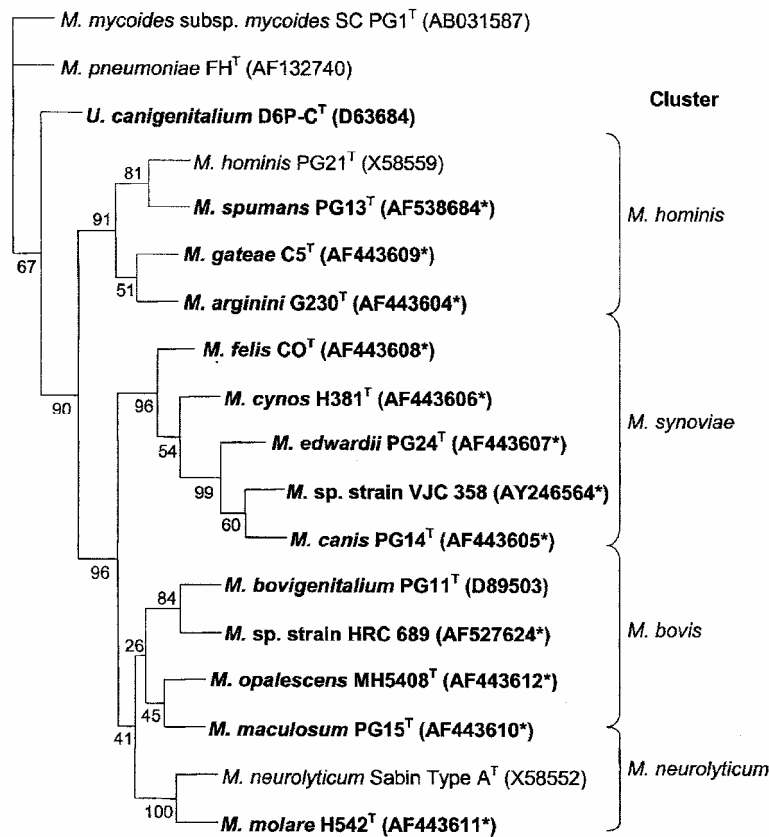
Parmi les mycoplasmes canins, le pourcentage d'homologie de séquence du gène codant l'ARN ribosomal 16S peut être très élevé. *Mycoplasma cynos* partage notamment 98 % de sa séquence avec *Mycoplasma canis* et *Mycoplasma edwardii*. Ces deux derniers mycoplasmes ont d'ailleurs 100 % d'homologie. La souche HCR 689 possède 93 % de similitude avec *M. bovis* (17). Cette correspondance pourrait expliquer les réactions sérologiques croisées pendant les tests d'inhibition de croissance entre les couples *Mycoplasma bovis* et *M. sp.* HCR 689 d'une part, et entre *Mycoplasma canis* et *Mycoplasma edwardii* de l'autre.

## (2) Par séquençage de la région inter génique espaçant les séquences des ARN ribosomaux 16S et 23S

Cette technique de séquençage appliquée à l'espace intergénique situé entre les gènes codant les ARN ribosomaux 16S et 23S est à l'origine d'un deuxième arbre phylogénétique. Présenté à la figure 6, il montre une répartition similaire d'une douzaine d'espèces de mycoplasmes « canins » et des deux souches VJC 358 et HCR 389 (17).

Les pourcentages d'homologie entre deux espèces voisines sont inférieurs à ceux obtenus via l'ARN ribosomal 16S. Par exemple, *Mycoplasma canis* ne partage plus que 54 % d'homologie avec *Mycoplasma cynos* et *Mycoplasma edwardii*. *Mycoplasma gateae* ne partage plus que 51 % d'homologie avec *Mycoplasma arginini*, au lieu de 94 %. L'utilisation de la région inter génique ARN ribosomal 16S-23S semble plus discriminante pour l'identification des espèces en routine par PCR, même si la majorité des laboratoires n'effectue pas ce test à l'heure actuelle (17).

**Figure 6 :** Arbre phylogénétique des mycoplasmes canins fondé sur le séquençage de l'espace inter génique situé entre l'ARN ribosomal 16S et l'ARN ribosomal 23S. D'après Chalker et Brownlie (17).

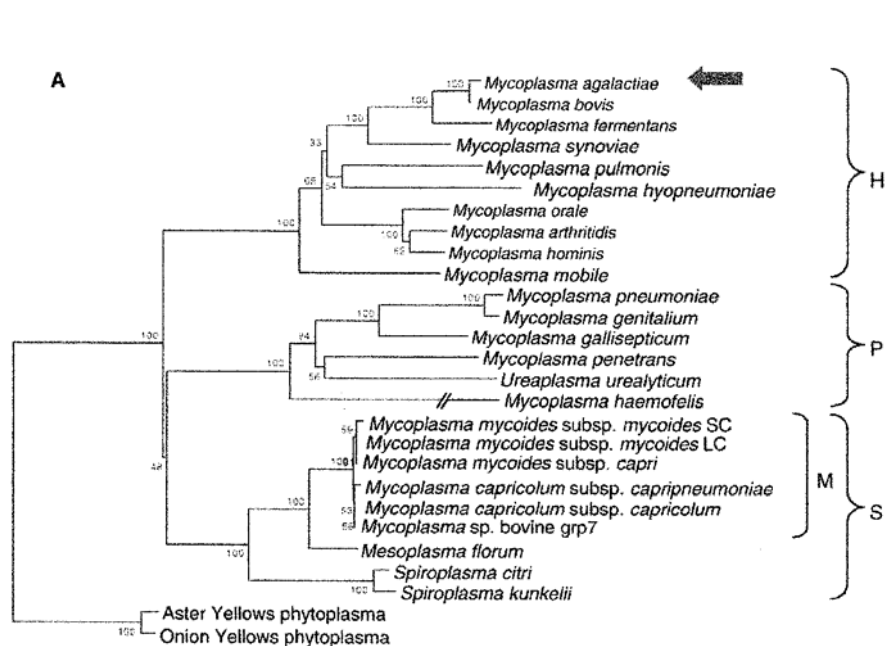


Le dénombrement des mycoplasmes par MF dot est seulement pratiqué par quelques laboratoires spécialisés. L'avènement de la PCR quantitative remplacera sans doute cette technique, une fois validée.

### **b) Chez les autres espèces**

Des arbres phylogénétiques concernant les principales espèces de mycoplasmes affectant les espèces humaines et domestiques ont été créés de la même manière, en utilisant la séquence de l'ARN ribosomal 16S. Un exemple est fourni à la figure 7 (82).

**Figure 7** : Arbre phylogénétique regroupant divers mycoplasmes d'intérêt vétérinaire et humain, fondé sur le séquençage de l'ARN ribosomal 16S. D'après Sirand-Pugnet *et al.* (82).



Les résultats obtenus par séquençage d'ARN de transfert montrent des profils parfois différents au sein d'une même espèce comme *A. laidlawii* : d'autres subdivisions au sein des espèces restent peut être à venir (86).

## **D. Relation avec l'hôte animal**

Les mycoplasmes se multiplient chez un hôte, mammifère, oiseau, insecte, poisson ou végétal, où ils jouent le rôle d'élément saprophyte, parasite ou commensal (64).

### **1. Lieux de colonisation des organismes animaux par les mycoplasmes**

La niche écologique des mycoplasmes est principalement composée par les muqueuses animales, milieu adapté à leur développement (74). Les muqueuses conjonctivales,

urogénitales (prépuce, vagin, portion distale de l'urètre), rectale et oropharyngée sont les lieux les plus colonisés chez les animaux et les hommes en bonne santé (13, 16, 49, 64, 74). Une même espèce peut être identifiée sur différents types de muqueuses (6, 16). Nous disposons à l'heure actuelle d'une seule étude mettant en évidence la présence de mycoplasmes commensaux au sein de l'utérus (75).

Chez les groupes de chiens présentant une affection siégeant sur ces muqueuses, la prévalence des mycoplasmes augmente sensiblement. Cette constatation fut un des premiers éléments en faveur du pouvoir pathogène des mycoplasmes (75).

Les tissus parenchymateux sont très rarement colonisés chez les animaux en bonne santé. Cependant, l'isolement y est plus fréquent en cas de maladie systémique. De plus, des mycoplasmes ont déjà été retrouvés dans des nœuds lymphatiques drainant le côlon lors de colites chez des boxers (75).

Au sein de l'appareil respiratoire, la plupart de chiens portent des mycoplasmes dans le pharynx (66, 75). Le portage atteint même 84 % de l'effectif de chiens sains d'après l'étude de RANDOLPH *et al.* (66). Sa présence au sein de l'appareil respiratoire inférieur suscite des conclusions contradictoires (18, 66, 74, 76). Jusqu'en 1993, aucun mycoplasme n'avait été isolé dans le poumon des chiens sains, mais RANDOLPH *et al.* ont isolé le genre *Mycoplasma* au niveau de la bifurcation trachéobronchique chez 27 % d'entre eux (66).

Les mycoplasmes ont longtemps été considérés comme extracellulaires, mais la capacité de ces bactéries à s'internaliser dans une cellule a récemment été démontrée. C'est notamment le cas de *Mycoplasma penetrans* qui profite de l'immunodépression chez l'espèce humaine à cette fin (79). Les fluoroquinolones, les tétracyclines et les macrolides et apparentés sont à l'origine de concentrations intracellulaires élevées, ces antibiotiques possèdent donc un intérêt évident dans le traitement des infections à mycoplasmes (68).

## **2. Spécificité de la relation**

La relation entre un mycoplasme et son hôte n'est pas stricte, contrairement à ce qui a d'abord été décrit. Plusieurs espèces de mycoplasmes affectent préférentiellement un hôte, mais sont aussi isolées chez d'autres espèces (16, 64). L'espèce *Mycoplasma canis*, que l'on pourrait penser spécifique de l'espèce canine, se multiplie aussi chez les bovins ou chez l'homme (16, 64, 73). *Mycoplasma bovis*, isolée chez le chien, a pour hôte principal l'espèce bovine (16).

La spécificité d'hôte doit donc être considérée comme préférentielle et non exclusive. Seront considérés comme mycoplasmes « canins » les mycoplasmes isolés seulement chez le chien, ou bien ceux isolés souvent chez le chien même s'il ne s'agit pas de leur hôte principal (16, 64).

## **3. Influence de l'antibiothérapie sur la relation hôte mycoplasme**

De nombreux éleveurs canins administrent des antibiotiques en routine aux femelles reproductrices pour tenter empiriquement de diminuer l'infertilité liée aux infections bactériennes (88). L'ampicilline et l'association triméthoprim-sulfamides appartiennent à deux catégories d'anti-infectieux couramment utilisés pour éradiquer les affections génitales des chiennes. La corrélation entre leur administration et la présence de mycoplasmes vaginaux a été étudiée sur un effectif de cinq chiennes de race Beagle (88). Aucun mycoplasme n'a été détecté avant le début du protocole. L'administration orale d'environ 20 mg/kg d'ampicilline a duré dix jours. Après une interruption de 37 jours, les mêmes chiennes ont reçu deux prises quotidiennes de triméthoprim et de sulfaméthoxazole pendant dix jours, la posologie journalière combinée avoisinant 20 mg/kg (88). Des mycoplasmes vaginaux étaient apparus dans deux cas sur cinq dès le troisième jour de traitement par l'ampicilline, et dans cinq cas sur cinq dès le septième jour d'administration de triméthoprim et de sulfaméthoxazole (88). Le traitement effectué pendant seulement dix jours a suffi pour perturber la flore vaginale des chiennes saines de l'étude (88). C'est pourquoi les administrations routinières ne doivent plus



être automatiques. Le risque d'émergence de mycoplasmoses sera d'autant plus grand si on utilise un antibiotique réputé inefficace contre les Mollicutes.



## **II. Influence des mycoplasmes sur la reproduction canine : comparaison des données acquises dans les espèces humaine et bovine**

### **A. Pouvoir pathogène des mycoplasmes**

#### **1. Pouvoir pathogène à l'échelle cellulaire**

##### **a) Subversion et exploitation de cellules hôtes**

###### **(1) Adhérence cellulaire**

L'adhérence aux cellules hôtes est la première étape vers la colonisation d'une muqueuse ou vers l'invasion cellulaire (51, 79). Cette adhérence est favorisée par les adhésines présentes à la surface des bactéries du genre *Mycoplasma*. Elles sont concentrées sur une partie de la bactérie appelée le « tip ». Le tip est en fait un prolongement cytoplasmique du mycoplasme qui prend une forme de bouteille (79).

Suite à cette adhésion, le fonctionnement des récepteurs membranaires et des canaux ioniques est altéré. Les toxines émises par les mycoplasmes et les phospholipases liées à leur membrane sont concentrées à proximité des cellules hôtes. L'adhérence favorise donc la vulnérabilité des cellules hôtes (79).

###### **(2) Invasion et fusion cellulaire**

La capacité des mycoplasmes à pénétrer dans une cellule est aujourd'hui prouvée. C'est l'apanage de *Mycoplasma penetrans*, qui participe aux infections opportunistes chez les humains affectés par le SIDA (79). La bactérie se localise dans le cytoplasme ou en région

périnucléaire. Après l'étape d'adhérence s'ensuit l'internalisation. Les microtubules et les microfilaments de la cellule hôte seraient détournés de leur rôle au cours de cette action mais les mécanismes de transduction du signal ne sont pas identifiés (79).

La capacité de fusion est présente chez les Mollicutes qui utilisent le cholestérol. Ce cholestérol est incorporé dans la membrane trilaminaire, ce qui initie la fusion avec la cellule hôte (79). Le genre *Acholeplasma* n'appartient donc pas aux mycoplasmes dits « fusogéniques ». De même, les souches de l'espèce *Mycoplasma capricolum* qui sont devenues indépendantes du cholestérol pour leur croissance ne parviennent plus à fusionner (79). Quant à la bactérie *Mycoplasma fermentans*, elle possède une phosphocholine membranaire inhabituelle à l'origine de son important potentiel de fusion (79).

Le maintien du gradient physiologique de protons de part et d'autre de la membrane mycoplasmaïque est requis chez certaines espèces, sinon elles perdent leur pouvoir de fusion (79).

### (3) Modification de la motricité cellulaire et ciliaire

La diminution de la motricité des cellules hôtes est la conséquence directe des facteurs de virulence évoqués précédemment. L'adhérence de *Mycoplasma hyopneumoniae* entraîne par exemple le dysfonctionnement des canaux potassiques : la membrane cellulaire est alors dépolarisée et la ciliostase induite (79). Une fois accolés à un épithélium cilié, les mycoplasmes occupent une position moins accessible aux défenses immunitaires de l'hôte (51).

En outre, les substances toxiques émises par les Mollicutes sont aussi responsables de la perturbation de la motricité cellulaire et ciliaire (79).

## **b) Action immunomodulatrice**

Les cellules de l'immunité affectées par les mycoplasmes sont les macrophages, les polynucléaires, les monocytes et les lymphocytes B et T.

D'une part, certains mycoplasmes évitent la phagocytose dans la plupart des cas. Un mécanisme d'échappement est la synthèse d'un polysaccharide capsulaire entourant la membrane trilaminaire. L'activation des macrophages est ainsi inhibée par *Mycoplasma dispar*.

L'action sur les monocytes et les polynucléaires dépend de l'espèce de Mollicute impliquée. Certaines espèces ont tendance à activer les macrophages, les monocytes, d'où une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'interleukine 1 (57, 79). Les autres espèces inhibent les monocytes et les polynucléaires (57, 79).

D'autre part, plusieurs espèces de mycoplasmes stimulent la prolifération polyclonale des lymphocytes B et T (57, 79). Cette activité mitogène peut s'accompagner de la différenciation ou non des cellules B en cellules productrices d'anticorps *in vitro* et *in vivo*. Les deux espèces *Mycoplasma fermentans* et *Mycoplasma penetrans*, espèces associées à l'infection par le virus du SIDA chez l'homme, sont dotées de cette particularité (79).

Enfin, la stimulation polyclonale des cellules T est responsable de la sécrétion de diverses cytokines, éléments amplificateurs de la réponse immunitaire (57, 77, 79).

## **2. Pouvoir pathogène à l'échelle moléculaire**

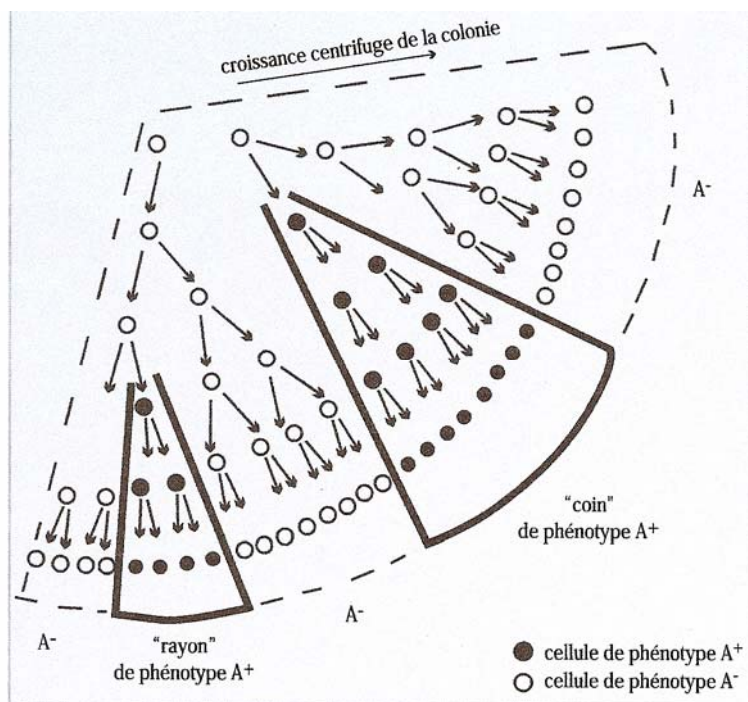
Trois caractéristiques permettent aux mycoplasmes d'interagir étroitement à l'échelle moléculaire avec le système immunitaire de l'hôte et d'orienter la réponse immunitaire en l'activant ou en l'inhibant. Il s'agit de leur hypervariabilité antigénique, de leur capacité

d'adhésion aux récepteurs sulfoglycolipidiques et de l'induction de composés cytotoxiques ou/et de cytokines.

#### a) Hypervariabilité antigénique

Les Mollicutes d'une même espèce sont dotés d'une hétérogénéité antigénique intraspécifique (57, 64). Les antigènes de surface des mycoplasmes sont instables, ce qui a été démontré par l'utilisation d'anticorps monoclonaux visant un épitope au sein des générations issues d'un même clone. Sur la figure 8, l'anticorps visant un épitope appelé A est appliqué au sein d'une colonie. Les coins marqués par la coloration noire sont ceux de phénotype A<sup>+</sup>, et les zones claires sont celles de phénotype A<sup>-</sup>. L'apparition et la disparition de rayons ou de coins noirs au fur et à mesure de la croissance centrifuge marquent un changement de phénotype au sein du clone, ce qui est la preuve de l'instabilité antigénique (64).

Figure 8 : Relation entre l'hétérogénéité de coloration de colonies de mycoplasmes et l'hypervariabilité antigénique. D'après Poumarat *et al.* (64).



La fréquence de ces mutations réversibles et aléatoires est élevée : elle se situe entre  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  par cellule au sein du clone (64, 79, 92).

Ces mutations touchent les lipoprotéines dites variables et les protéines non liées à des lipides. Ce sont les deux principaux systèmes antigéniques hypervariables ou SAHs des mycoplasmes. Les mutations modifient le cadre de lecture des protéines et la longueur des structures répétées (64). Ainsi, on parle à la fois de variabilité dans la taille et dans l'expression des protéines de surface. La mise en évidence de variation du poids moléculaire d'une protéine de surface est aussi une preuve de la variabilité antigénique (92).

Les SAHs sont présents chez de nombreux mycoplasmes pathogènes d'intérêt vétérinaire ou humain (64, 79). Les espèces hypervariables connues comprennent notamment *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* et *Mycoplasma hominis* chez l'homme, et *Mycoplasma bovis* chez les bovins.

Chez le cheval, *Mycoplasma equigenitalium* et *Mycoplasma subdolum* sont à l'origine de protéines de surface immunogènes appelées pST 17, pST 42, et pET 45. Ce sont deux espèces associées à des troubles de la fertilité chez les équins et responsables d'effet cytopathique sur l'épithélium cilié. La corrélation entre la présence ou l'absence de ces protéines, leur taille et le statut clinique des hôtes n'a pas été démontrée (92).

Les fonctions des systèmes antigéniques hypervariables ne sont pas encore élucidées mais il existe plusieurs hypothèses (64, 79). Les protéines et lipoprotéines de surface interviendraient dans l'adhérence cellulaire et la fusion avec les cellules hôtes, avec un tropisme tissulaire élargi grâce aux variations engendrées. De plus, on peut supposer que l'hypervariabilité des antigènes de surface est un mécanisme d'échappement de la réponse immunitaire de l'hôte, soit par diminution de l'accessibilité des épitopes reconnus, soit par disparition de ces derniers. Ce mécanisme justifierait l'émergence d'infections chroniques (57, 64, 79).

#### **b) Adhésion aux récepteurs sulfoglycolipidiques**

Deux types de glycolipides sulfatés sont portés sur la membrane des spermatozoïdes de mammifère : le sulfogalactosylcéramide ou SGC et le sulfogalactoglycérolipide ou SGG. De récentes études ont montré que ces molécules interviennent en tant que récepteur dans la

liaison ovocyte/spermatozoïde. Or LINGWOOD a démontré que de nombreux mycoplasmes lient ces récepteurs sous leur forme sulfatée, ce qui pourrait interférer avec le processus de fécondation (50).

L'implantation de l'œuf sur l'endomètre utérin est aussi une fonction attribuée au SGC : toute infection chronique du tractus génital femelle par les mycoplasmes devient dans ce cas une cause d'infertilité logique, mais ceci reste à prouver (50).

### **c) Induction de la synthèse de composés cytotoxiques et de cytokines**

L'activation de la réponse immunitaire se produit en cascade. L'activation des macrophages et des monocytes engendre la synthèse de nombreuses cytokines comme le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), les interleukines 1 et 6, et les chémokines responsables de la chimioattraction des monocytes (77, 79). Cette synthèse a par ailleurs été observée *in vitro* (77). Un facteur de stimulation des granulocytes et des monocytes, des prostaglandines et des dérivés nitrés et oxygénés sont également synthétisés, d'où ce phénomène de cascade ... (77, 79). Il s'ensuit une augmentation de l'expression des molécules d'histocompatibilité de classes I et II, et de l'expression de molécules de costimulation sur la membrane des leucocytes et des cellules endothéliales (79). Les leucocytes ainsi recrutés s'extravasent vers le site de l'infection et occasionnent des dommages tissulaires (79).

L'origine moléculaire de cette stimulation reste indéterminée hormis dans le cas de *Mycoplasma arthritidis* qui sécrète un superantigène responsable d'une infection chronique et de l'activation de lymphocytes cytotoxiques (51, 77, 79).



## **B. Influence des mycoplasmes en reproduction**

### **1. Isolement des mycoplasmes dans le tractus urogénital des individus sains**

#### **a) Dans l'espèce humaine**

*Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma spp.*, qui comprend les deux biovars *Ureaplasma parvum* et *Ureaplasma urealyticum*, constituent les espèces considérées comme commensales de l'appareil génital des humains (3, 6, 41).

Avant l'utilisation de la PCR, l'espèce *Mycoplasma genitalium* avait été rarement isolée mais elle semblait posséder un pouvoir pathogène important, en dépit des quelques études à son sujet (41). Aujourd'hui, la PCR démontre la présence de *Mycoplasma genitalium* chez 0 à 15 % des hommes asymptomatiques (39).

*Ureaplasma spp.* est le premier Mollicute commensal en terme de prévalence : il fait partie de la flore vaginale de 40 à 80 % des femmes et de la flore génitale de 20 à 40 % des hommes. La flore génitale comporte *Mycoplasma hominis* dans moins de 10 % des cas dans les deux sexes (3, 6).

#### **b) Dans l'espèce bovine**

Les espèces impliquées sont :

-*Ureaplasma diversum*

-*Mycoplasma bovigenitalium*

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne la fréquence d'isolement de ces bactéries à l'état de commensal uniquement. *Ureaplasma diversum* colonise communément le prépuce, la partie distale de l'urètre et la semence du taureau ainsi que la vulve et le vestibule vaginal

chez la vache. Par contre, on suspecte une affection chez la femelle si cette bactérie est isolée à partir de l'utérus ou du mucus cervico-vaginal (9).

**c) Dans l'espèce canine**

Chez l'espèce canine, 13 Mollicutes ont été isolés dans le tractus génital des mâles et des femelles saines (13, 16, 22) :

- Acholeplasma laidlawii*
- Mycoplasma bovigenitalium*
- Mycoplasma canis*
- Mycoplasma cynos*
- Mycoplasma edwardii*
- Mycoplasma felimutum*
- Mycoplasma gateae*
- Mycoplasma maculosum*
- Mycoplasma molare*
- Mycoplasma opalescens*
- Mycoplasma spumans*
- Mycoplasma sp.* strain HRC 689
- Ureaplasma canigenitalium*

Chez le mâle, on a isolé le genre *Mycoplasma* dans le tractus génital de 64 à 80 % des chiens normo fertiles il y a plus de vingt ans (13, 22). Ce pourcentage élevé ne semble pas démenti par l'étude plus récente de ROOT KUSTRITZ *et al.* : 60 % des spermes canins dépourvus de cellules inflammatoires ont conduit à l'isolement du genre *Mycoplasma* (72). Les sites d'isolement fréquent sont le prépuce, la prostate et la semence (13, 16, 22). Les informations concernant le type de prélèvement effectué pour mettre en évidence un Mollicute au sein de la prostate ne sont pas explicitées (16). Le genre *Ureaplasma* est présent chez moins de 9 % des mâles fertiles selon l'étude de DOIG.

Chez la femelle, les premières études concluaient à une prévalence du genre *Mycoplasma* de 70 à 88 %, le vagin étant le site de prélèvement préférentiellement choisi (13, 22). Cette prévalence fut évaluée à 45 % lorsque la MF dot fut utilisée à cet escient. Le genre *Ureaplasma* est présent dans la flore vaginale de 37 à 40 % des chiennes fertiles. L'utérus est mentionné en tant que site d'isolement chez 2 % des femelles normo fertiles dans une publication datant de 1982, mais il n'est pas précisé si les prélèvements incluent le col, le corps ou les cornes de l'utérus (75).

Ainsi, le genre *Mycoplasma* est un commensal fréquent chez les deux sexes, alors que le genre *Ureaplasma* est apparemment un commensal plus fréquent chez la femelle que le mâle (22). Parmi les espèces présentes, *Mycoplasma canis* est la plus répandue dans la sphère génitale (13, 22, 51). Chez la chienne, la flore est plus souvent mixte que chez le mâle (22).

On isole ainsi qualitativement de nombreux mycoplasmes chez des individus indemnes de troubles de la reproduction, sans bénéficier de données se rapportant à la quantification des Mollicutes dans l'appareil urogénital de l'humain, des bovins et des chiens. On comprend alors pourquoi le diagnostic des mycoplasmoses en l'absence de dénombrement peut s'avérer difficile.

## **2. Association des mycoplasmes avec les infections du tractus urogénital**

Comme il a été décrit précédemment, le dénombrement des mycoplasmes est une technique peu courante, c'est pourquoi la majorité des études portant sur la pathogénicité des mycoplasmes compare la prévalence de cette bactérie chez un groupe témoin avec celle obtenue chez un groupe composé d'individus présentant des infections naturelles. Les conclusions sont peu évidentes à formuler si la différence obtenue n'est pas significative. Cela explique les réserves émises par les auteurs dans la majorité des publications récentes.

a) Dans l'espèce humaine

(1) Infections naturelles du tractus génital

(a) Chez l'homme

*Mycoplasma genitalium* a déjà été isolée au sein de l'urètre de patients présentant une épididymite ou dans le tissu prostatique d'hommes atteints de prostatite, ce qui laisse soupçonner une capacité d'infection du tractus génital de l'homme (78). Pour l'instant, les études associant *Mycoplasma genitalium* aux épididymites et aux prostatites sont encore manquantes (78).

(b) Chez la femme

Une fois de plus, *Mycoplasma genitalium* semble posséder une pathogénicité plus évidente que les autres mycoplasmes génitaux. Il est d'ailleurs associé de façon significative à l'infertilité tubaire chez la femme (41).

La responsabilité de *Ureaplasma urealyticum* (sans distinction des biovars) et de *Mycoplasma hominis* dans les infections génitales est difficile à établir (3, 41, 60). Les mycoplasmes ont longtemps été considérés comme responsables de la vaginose bactérienne, elle-même responsable d'infections génitales telles que les chorioamniotites et les endométrites présentes après un accouchement ou un avortement, ainsi que de fièvres post-partum (6, 41, 60). Toutefois, la vaginose bactérienne est un déséquilibre de la flore vaginale qui intéresse surtout les bactéries anaérobies et aussi potentiellement les mycoplasmes (41). L'origine des complications reste donc complexe et discutée encore aujourd'hui (41). Il a été prouvé que *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* exercent un rôle prépondérant dans les endométrites et les fièvres post-partum où ils ont pu être isolés à plus de  $10^4$  ccu dans des échantillons sanguins et des lochies prélevés sur des patientes (60).

Les infections gynécologiques imputées à *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* et *Ureaplasma urealyticum* sont les cervicites, les endométrites et les salpingites (6, 11, 41). Même s'ils ne sont pas considérés comme des pathogènes principaux provoquant ces

infections par tous les auteurs, il est admis que le pouvoir pathogène des mycoplasmes peut s'exprimer en présence d'autres microorganismes pathogènes (41). L'incertitude persiste notamment car il n'a pas été démontré qu'ils pouvaient être les seuls pathogènes en cause dans les infections pelviennes (41).

## (2) Infections naturelles du tractus urinaire

Chez l'homme, deux espèces de mycoplasmes sont des agents responsables d'urétrites non gonococciques (UNG) : *Ureaplasma urealyticum* au sens large (appellation qui regroupe les deux biovars *urealyticum* et *parvum* aujourd'hui) et *Mycoplasma genitalium* (6, 39, 78).

Des données plus anciennes les ont mis en cause dans 15 à 20 % des cas d'UNG pour *Ureaplasma urealyticum* et dans 10 % des cas pour *Mycoplasma genitalium* (6). Grâce à l'avènement de la PCR, une différence significative et plus importante est mise en évidence en ce qui concerne *Mycoplasma genitalium* : on obtient 18 à 46 % de prévalence chez les hommes présentant une UNG et indemnes de *Chlamydia* contre 0 à 15 % chez les hommes asymptomatiques. *Mycoplasma genitalium* est par ailleurs soupçonné de participer à des récurrences d'UNG (39, 78).

A la différence de *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* est isolé à la fois dans la vessie mais aussi dans certaines portions du tractus urinaire supérieur comme le bassinet lors de pyélonéphrite (91). La contamination ascendante des prélèvements semble peu probable dans la mesure où le germe est cultivé en culture pure et que le patient n'a pas d'antécédent de pyélonéphrite, d'obstruction urinaire ou de sondage urinaire dans plusieurs cas (91).

Une participation des uréaplasmes dans l'étiologie des pyélonéphrites n'est pas exclue et *Mycoplasma hominis* est donc à ce jour considéré comme un pathogène très probable du tractus urinaire supérieur (91).

## **b) Dans l'espèce bovine**

### **(1) Infections naturelles du tractus génital**

#### **(a) Chez le taureau**

*Ureaplasma diversum* appartient à la flore commensale du tractus génital du taureau : il est présent dans la semence, sur la muqueuse vésicale, dans les ampoules et les vésicules séminales. Il est absent dans les testicules et les canaux déférents des taureaux normo fertiles (9). La présence d'*Ureaplasma* dans le prépuce et dans la semence est significativement associée à la survenue de balanoposthite (9).

*Mycoplasma bovis* est souvent isolé dans les glandes séminales de jeunes mâles asymptomatiques.. *Mycoplasma bovis* est à l'origine de séminovésiculites naturelles. On l'isole aussi à cette occasion dans la queue de l'épididyme, la vessie, la prostate, les reins et les poumons des animaux infectés (58, 59).

#### **(b) Chez la vache**

Chez la vache, *Ureaplasma diversum* a été mis en cause dans la vulvite granuleuse depuis qu'un taux d'isolement de 100 % a été obtenu chez un groupe de femelles présentant une vulvite granuleuse aigue (9, 45, 53). Ce taux égalait 74 % chez les vaches montrant une hyperhémie vulvaire modérée. La différence étant significative, le caractère pathogène de *Ureaplasma diversum* dans l'apparition de la vulvite granuleuse fut reconnu, d'autant plus que l'affection est reproductible expérimentalement (21). *Mycoplasma bovis* peut être aussi à l'origine de vulvo-vaginite granuleuse (4, 9).

Les signes cliniques observés lors de vulvite granuleuse aiguë apparaissent trois à six jours après la mise à la reproduction. Ils comportent un écoulement muco-purulent qui peut perdurer pendant dix jours, une inflammation et une congestion vulvaire, l'apparition de nodules de 1 à 2 mm de diamètre de couleur grise ou marron. Ces nodules sont regroupés autour du clitoris et s'étendent jusqu'aux parois latérales du vagin ; ils résultent en fait d'une accumulation de lymphocytes (9, 53). Lorsque l'infection devient chronique, les écoulements

s'éclaircissent, et des formations lymphoïdes blanches apparaissent en grappe ou en ligne sur la paroi dorso-latérale de la vulve ou sur la commissure dorsale du vestibule du vagin.

Les infections du tractus génital supérieur ont été observées à la suite d'accouplements. La transmission vénérienne conduit le plus souvent à des endométrites et à des salpingites, plus rarement à des cervicites, cela dans les jours qui suivent l'insémination naturelle.

## (2) Infections expérimentales du tractus génital

### (a) Chez le taureau

L'inoculation de *Mycoplasma bovis* dans la glande vésiculaire de taureaux reproduit une vésiculite qui peut même s'étendre à la glande controlatérale. La dégénérescence de l'épithélium, la fibrose de la glande et l'accumulation de cellules inflammatoires sont d'autant plus fréquentes que l'inoculum est concentré (59).

### (b) Chez la vache

Plusieurs affections naturelles ont pu être reproduites expérimentalement par inoculation de *Ureaplasma diversum* au sein de l'appareil reproducteur de la vache.

Les animaux choisis pour être engagés dans le protocole d'inoculation vulvaire sont des génisses préalablement déterminées indemnes de lésion de vulvite et testées séronégatives pour la leptospirose, la brucellose et la rhinotrachéite infectieuse bovine. Chez 89 % des femelles, une vulvite granuleuse dont les signes cliniques sont similaires à ceux de l'infection naturelle survient. Les inoculations intra cervicales et intra-utérines sont aussi à l'origine d'endométrite et de salpingite (21).

Ainsi, les signes cliniques et les lésions histologiques provoqués par *Ureaplasma diversum* chez la femelle infectée spontanément et chez la femelle inoculée sont similaires. A la différence des protocoles concernant l'espèce canine, les conclusions sont donc nettement en faveur de l'acceptation du caractère pathogène des Mollicutes.

### c) Dans l'espèce canine

#### (1) Infections naturelles du tractus génital

##### (a) Chez le mâle

Les balanoposthites, les orchépididymites, et les prostatites sont les infections génitales mâles relevées dans la littérature et imputées avec plus ou moins de certitude aux mycoplasmes. Comme dans le cas des infections du tractus génital femelle et de l'infertilité canine en général, les auteurs les plus affirmatifs citent les publications en médecine bovine et humaine et les inoculations expérimentales chez le chien en guise de justification (25, 47, 54, 55, 75). Les autres soutiennent le plus souvent que le postulat de Koch n'a pas été respecté pour prouver la pathogénicité des mycoplasmes au cours des infections expérimentales et naturelles (49). La description de la méthode et des résultats des inoculations expérimentales est indispensable pour comprendre ces divergences d'interprétation des résultats expérimentaux.

Chez le mâle, respectivement 92 % et 15 % des animaux affectés par une balanoposthite portent le genre *Mycoplasma* et le genre *Ureaplasma* dans le prépuce. Une différence significative a pu être mise en évidence entre les mâles normo fertiles et infertiles pour ces deux genres. Sans pour autant être univoques, ces résultats renforcent l'idée que les mycoplasmes possèdent un pouvoir pathogène et peuvent être la cause d'infertilité dans l'espèce canine (22).

##### (b) Chez la femelle

Il existe une publication concernant la différence de prévalence sur la paroi vaginale chez les chiennes saines et celles présentant un écoulement vaginal purulent ou une vaginite. Le prélèvement s'effectue bien sûr à l'aide d'un écouvillon stérile protégé des contaminations jusqu'à la rotation contre la paroi du vagin (22). 88 % des chiennes présentant un écoulement vulvaire purulent étaient positives pour le genre *Mycoplasma*, 75 % des chiennes de ce même



groupe étaient positives pour le genre *Ureaplasma*. En cas de vaginite, 95 % des chiennes portent *Mycoplasma* et 50% le genre *Ureaplasma* (22).

En raison de la prévalence importante chez les chiennes saines, une différence significative n'a pas pu être mise en évidence même si elle augmente en cas d'infection vaginale. Une augmentation du nombre de chiennes prélevées pourrait peut être résoudre ce problème (22).

Certains auteurs imputent aux mycoplasmes la possibilité de provoquer des pyomètres et des endométrites chez la chienne (48, 54, 55) mais cette hypothèse est le plus souvent formulée avec plus de réserve en raison du manque de description de cas d'infection naturelle et des résultats controversés obtenus en cas d'inoculation expérimentale (1, 16, 35, 49, 75).

## (2) Infections naturelles du tractus urinaire

Les publications ayant pour thème l'implication des mycoplasmes dans les infections du tractus urinaire sont peu nombreuses. Les trois études de JANG *et al.*, L'ABEE-LUND *et al.* et ULGEN *et al.* utilisent des techniques de recueil des échantillons et d'identification parfois différentes (40, 46, 93). Néanmoins, plusieurs éléments communs à ces trois études tendent à démontrer le caractère pathogène de *Mycoplasma canis*. L'isolement de *M. canis* en culture pure à partir de la paroi sectionnée de l'épididyme d'un chien, au cours d'une castration thérapeutique, a été effectué au cours de l'étude de L'ABEE-LUND *et al.* (46).

La cystocentèse antépubienne a été la méthode de collecte des urines dans les études de JANG *et al.* et ULGEN *et al.* (40, 93). Comme les mycoplasmes sont commensaux des muqueuses vaginales et urétrales, cette technique est la meilleure pour éviter la contamination des urines occasionnée par la miction spontanée, et préciser le rôle des mycoplasmes dans les infections urinaires (93). L'étude de L'ABEE-LUND *et al.* fait état de prélèvements recueillis par miction simple, cathétérisation urétrale ou par éjaculation (46). La contamination par la flore des voies basses est alors possible (46).

La PCR a été la méthode de spéciation des mycoplasmes dans l'étude datant de 2003. Les critères biochimiques de fermentation et les tests sérologiques comme l'inhibition de croissance et l'immunofluorescence ont été utilisés dans les trois études (40, 46, 93).

Les trois études ont en commun le fait que la majorité des mycoplasmes identifiés appartiennent à l'espèce *M. canis*. 24 des 29 isolats identifiés dans l'étude de JANG *et al.*, les 4 isolats de l'étude de ULGEN *et al.* et les 9 isolats de l'étude de L'ABEE-LUND *et al.* sont tous constitués par cette même espèce (40, 46, 93). *M. spumans* et *M. cynos* sont les deux autres espèces identifiées dans les urines récoltées (40). De plus, *Mycoplasma canis* a été isolée en culture pure sur la plupart des prélèvements effectués par cystocentèse (40, 93) ou par d'autres techniques (46).

Ces deux résultats sont en faveur du classement de *M. canis* parmi les pathogènes du tractus urinaires sans pour autant déterminer si la bactérie se comporte en pathogène primaire ou secondaire dans cet appareil. La prévalence de cette affection est faible : elle est responsable de quelques cas sur cent lors d'infection du tractus urinaire. Seules les espèces des genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma* ont été recherchées lors de la spéciation. Le rôle du genre *Acholeplasma* reste donc un sujet d'investigation.

La symptomatologie en cas d'infection à *M. canis* comporte la polyuro-polydipsie, l'hématurie, la strangurie, la pollakiurie, l'incontinence urinaire, la douleur abdominale ainsi que plusieurs symptômes généraux tels que la fièvre ou l'anorexie (40, 46, 93). Ces symptômes sont observables en cas de cystite, de glomérulonéphrite ou de pyélonéphrite, infections pour lesquelles *Mycoplasma canis* a été isolée en culture pure (40, 93). Enfin, des carcinomes et des calculs urinaires sont également associés à *M. canis* en culture pure (40).

### (3) Infection expérimentales

#### (a) Chez le mâle

L'inoculation expérimentale de trois chiens mâles de race Beagle en 1974 a été effectuée à l'aide d'un inoculum provenant de chiennes présentant des troubles de la reproduction, contenant *M. canis* à hauteur de  $10^7$  à  $10^8$  cfu/ml (47). Après vasotomie, 0,25 ml de

l'inoculum était injecté dans le canal déférent droit puis ce canal était réimplanté en sous-cutané afin de recueillir périodiquement la semence par l'intermédiaire d'une fistule. Les anomalies portées par les spermatozoïdes et les mycoplasmes sont ensuite recherchés tous les deux à trois jours. En fin de protocole, soit trente jours après inoculation, les deux testicules et les deux épидидymes sont retirés pour procéder aux analyses histologiques.

- Résultats de l'étude

Trois à quatre semaines après inoculation, deux des animaux inoculés présentent des signes cliniques : une augmentation de taille, une douleur et une augmentation de température au niveau du testicule droit et un œdème au niveau du scrotum (47). Le testicule droit et son épидидyme ont acquis chez ces animaux une consistance plus élastique. Les modifications histologiques rapportées sont une orchite purulente avec une desquamation et une nécrose focale de l'épithélium tubulaire et de l'interstitium dans un des deux cas. Une vacuolisation importante dans l'épithélium tubulaire et une infiltration leucocytaire dans l'albuginée sont présentes chez le deuxième animal inoculé présentant des symptômes. Ces deux animaux ont par ailleurs montré une augmentation du taux de spermatozoïdes anormaux après inoculation. Aucune modification significative n'a été détectée chez l'animal contrôle ou chez le troisième animal inoculé asymptomatique.

Au cours des analyses microbiologiques, un seul prélèvement a conduit à l'isolement de *Mycoplasma canis* : il s'agit du sperme collecté 4 jours après inoculation chez un des animaux symptomatique. Au-delà, aucun mycoplasme n'a été détecté chez tous les animaux inoculés (47). De plus, il n'est pas fait mention d'analyses microbiologiques après exérèse des gonades.

- Conclusion de l'étude et utilisation bibliographique

L'étude conclut que l'orchi-épидидymite unilatérale droite constatée sur les animaux inoculés est visiblement due à l'inoculation de mycoplasmes et rappelle que des symptômes similaires ont été constatés au cours d'infections naturelles et expérimentales de l'appareil génital chez le taureau (47).

### (b) Chez la femelle

Il existe une seule étude consacrée à l'infection expérimentale de l'appareil génital femelle par les mycoplasmes, ce qui contraste avec la multiplicité des études menées sur les bovins (21, 38, 45, 52, 53).

Dix chiennes de race Beagle sont examinées avant inoculation. Elles ont préalablement été déclarées indemnes de mycoplasmes car ces bactéries n'ont pas été isolées sur le vagin et le col de l'utérus avant inoculation. La muqueuse du vagin, du vestibule du vagin et le col sont inspectés lors d'un examen externe. La technique d'exploration du col de l'utérus n'est pas décrite. L'utérus est palpé : la consistance et le diamètre des cornes utérines sont notés. L'inoculum est le même que celui utilisé dans le cadre de l'infection expérimentale des chiens mâles. Il est introduit dans la corne utérine gauche au cours d'une laparotomie. Une biopsie est effectuée au même moment. Des écouvillons du col, du vestibule vaginal et du vagin ont lieu régulièrement jusqu'à la nécropsie. Des prises de sang sont réalisées pour mesure le titre d'anticorps anti-mycoplasmes après inoculation. Les méthodes d'identification des mycoplasmes sont les critères de fermentation et les méthodes sérologiques, l'étude datant de 1979 (38).

- Résultats de l'expérience

Cinq des dix femelles inoculées présentent trois jours post inoculation des mycoplasmes localisés à la fois au niveau du col utérin, au niveau du vestibule du vagin et au niveau du vagin. L'isolement va se poursuivre pendant plus d'une semaine chez ces chiennes. Une estimation semi-quantitative dont la méthode n'a pas été décrite révèle que le col utérin était plus riche en mycoplasmes que le vestibule du vagin, lui-même plus riche en mycoplasmes que le vagin. Deux de ces cinq femelles présentent au cours de la nécropsie une endométrite purulente. Une autre femelle présente une hyperplasie glandulokystique. Un phlegmon intra-pariétal a été mis en évidence sur une chienne sur laquelle des mycoplasmes ont été isolés temporairement après inoculation (38).

Une séroconversion importante à l'égard de *Mycoplasma canis* a été mise en évidence dans un des cas d'endométrite (38).

- Conclusion de l'étude et utilisation bibliographique

Les expérimentateurs concluent que la présence de *Mycoplasma canis* du col utérin jusqu'au vagin est due à la migration et à la colonisation par l'inoculum. La séroconversion a lieu dix à quatorze jours après inoculation et les lésions histologiques sont semblables à celles provoquées par les infections expérimentales dans l'espèce bovine (38).

Toutefois, l'absence de *M. canis* au sein des lésions lors de la nécropsie et le petit nombre d'animaux inoculés permettent difficilement de conclure que la souche inoculée est responsable de l'infection (16, 49).

Même si les arguments en faveur du pouvoir pathogène des mycoplasmes au sein du tractus urinaire sont forts, il n'en est pas de même pour le tractus génital supérieur du chien et de la chienne. Afin de démontrer que les mycoplasmes sont responsables d'infections génitales hautes dans l'espèce canine, il faudrait en premier lieu rechercher la présence de cultures très abondantes ou pures des genres *Ureaplasma* et *Mycoplasma* dans la prostate, le testicule, l'épididyme, l'utérus et l'oviducte de patients présentant une affection de ces organes. La biopsie écho guidée ou le recueil d'échantillons par endoscopie de l'endomètre seront les méthodes de choix car elles limitent la contamination des prélèvements par les mycoplasmes commensaux. En cas de résultat positif, la détermination de l'espèce impliquée compléterait l'étude.

Comme les mycoplasmes provoquent des pyélonéphrites chez l'humain, il serait aussi judicieux de rechercher la présence de Mollicutes lorsque l'on cherche à déterminer l'agent responsable de cette affection chez un chien.

### **3. Influence des mycoplasmes sur la qualité du sperme**

#### **a) Chez l'homme**

Dans l'étude de SVENSTRUP *et al.*, l'utilisation de la transmission de rayons X et de l'immunofluorescence a permis d'obtenir les résultats suivants : les mycoplasmes sont

capables de se lier à la tête, à la pièce intermédiaire et à la queue de spermatozoïdes (89). La structure d'attachement a pu être décrite pour *Mycoplasma genitalium* et il s'avère que ce Mollicute dispose d'un tip terminal riche en électrons (89). Lorsque les mycoplasmes adhèrent en grande quantité à un spermatozoïde, leur motilité est compromise. Les spermatozoïdes liés à un petit nombre de mycoplasmes sont encore doués de motilité. Le potentiel d'agglutination et de tératozoospermie dû à *Mycoplasma genitalium* reste un sujet de controverse dans la littérature, mais la démonstration de l'attachement est un argument en faveur de la transmission vénérienne des mycoplasmes dans l'espèce humaine (89).

#### **b) Chez le taureau**

*Ureaplasma diversum* modifie le pH et la viscosité du sperme, mais n'engendre ni anomalies supplémentaires, ni diminution du volume de l'éjaculat et de la concentration en spermatozoïdes. Les échantillons de sperme récoltés par les collaborateurs de SPRECHER *et al.* ont pu être contaminés par une flore qui n'est pas issue du testicule ou de l'épididyme, c'est pourquoi les conclusions obtenues sont peut être biaisées (9, 85).

Quant à *Mycoplasma bovis genitalium*, plus la bactérie est concentrée dans les glandes séminales, plus la motilité globale de la semence diminue (58, 59). Une autre étude rapporte une motilité inférieure à 20 % après un cycle de congélation /décongélation en cas d'infection naturelle à *Mycoplasma bovis genitalium* (59). Grâce à la microscopie électronique, la preuve a été faite que *Mycoplasma bovis genitalium* se lie aux spermatozoïdes, de préférence à la tête de ces cellules mais aussi sur la pièce intermédiaire et la queue. Aucune différence dans l'intégrité de l'acrosome n'a pu être mise en évidence. Un dysfonctionnement de la pièce intermédiaire reste une hypothèse possible de la baisse de motilité atteignant le sperme congelé (58).

#### **c) Chez le chien**

Les données concernant l'espèce canine sont limitées à la constatation d'une augmentation du taux de spermatozoïdes anormaux sur deux chiens inoculés avec *Mycoplasma canis* (47).

Pour mettre en évidence une infertilité consécutive à l'altération du sperme par les mycoplasmes chez le chien, il serait préférable de rechercher des différences statistiques concernant la motilité, les anomalies et la concentration des spermatozoïdes entre deux lots de chiens. Le premier lot serait un lot témoin composé par des chiens normo fertiles et le second lot serait composé par des chiens dont le sperme serait anormalement riche en mycoplasmes. Cependant, les différentes fractions de l'éjaculat peuvent être contaminées par la flore commensale urétrale, c'est pourquoi il faut disposer d'une technique de dénombrement des mycoplasmes. En effet, on s'attend logiquement à une culture pure ou à la fois mixte et très abondante d'un genre de mycoplasme si la contamination résulte de l'infection des testicules, de l'épididyme ou de la prostate. Inversement, s'il s'agit d'une contamination du sperme par la flore commensale urétrale, une culture mixte avec une concentration modérée en mycoplasmes sera attendue.

#### **4. Influence des mycoplasmes sur la gestation**

##### **a) Chez la femme**

Les infections ascendantes du tractus génital de la femme contribuent à plus de 50 % des accouchements prématurés.

Le genre *Ureaplasma* durant la gestation exerce une influence similaire chez la femme et la vache. La transmission verticale est admise car les deux espèces *U. urealyticum* et *U. parvum* ont toutes deux été isolées à partir de liquide amniotique (42). Encore une fois, c'est l'association statistique entre la colonisation vaginale et l'affection invoquée qui permet de d'estimer une pathogénicité très probable du Mollicute testé.

Toutes les études ne sont pas convergentes. *Ureaplasma urealyticum* sans distinction des deux biovars est parfois présenté comme un facteur de risque de prématurité et de faible poids de naissance chez l'espèce humaine (23, 42, 61). Chez l'espèce humaine, on associe depuis la distinction entre les deux biovars l'espèce *Ureaplasma parvum* à des interruptions de

gestation tardives et à des accouchements prématurés (42). La sécrétion de phospholipase A2 par cet uréaplasme serait à l'origine des contractions utérines précoces (3).

#### **b) Chez la vache**

La transmission des mycoplasmes peut s'effectuer verticalement, de la mère au fœtus. Les interruptions de gestation liées à *Ureaplasma diversum* sont rares : elles surviennent en milieu ou en fin de gestation et s'accompagnent souvent de rétention placentaire. Les lésions de vulvite ne sont en général pas présentes mais des lésions typiques affectent le poumon de l'avorton et les annexes placentaires. Elles permettent d'établir le diagnostic en plus de l'isolement de l'agent pathogène au sein de ces organes ou de l'estomac de l'avorton (9, 53). A la nécropsie, les poumons sont indurés et oedémateux. L'histologie révèle une pneumonie interstitielle non diffuse et une accumulation de granulocytes neutrophiles et de macrophages dans la lumière des voies respiratoires (9, 53). Les accumulations lymphoïdes péri bronchiques sont possibles mais non systématiques.

L'allantochorion inter cotylédonaire s'épaissit et prend une couleur blanche à marron. Les cotylédons deviennent adhérents aux caroncules et prennent une teinte rouge foncée (9).

Les lésions concernant l'amnios sont multifocales ou bien étendues localement. Elles associent les phénomènes d'hémorragie, de nécrose, de fibrose et de minéralisation. Une artérite peut affecter l'ensemble des annexes (9, 53).

Après inoculation intra-amniotique, *Ureaplasma diversum* suscite des avortements tardifs. Les lésions nécropsiques sont identiques à celles listées dans le cadre des avortements naturels et *Ureaplasma diversum* est systématiquement isolée dans le placenta des vaches inoculées (9, 52). Cette bactérie est donc légitimement décrite comme responsable d'avortement chez la vache (9).



### c) Chez la chienne

LEIN décrit en 1986 un syndrome d'infertilité caractérisé par une mort embryonnaire précoce, une résorption fœtale, des avortements, une faiblesse des chiots nouveaux nés et une augmentation de la mortalité néonatale (48). Des Mollicutes des genres *Ureaplasma* et *Mycoplasma* ont été isolés pour chacun de ces événements (48). Cependant, l'auteur ne décrit pas l'anamnèse des patients affectés par ce syndrome. Il est aussi très regrettable que l'auteur ne précise pas de quelle façon il effectue ses prélèvements, quelles sont les méthodes d'identification, et si les microorganismes sont obtenus en culture pure ou non (48, 49).

La description succincte de ce syndrome est reprise par la plupart des auteurs sans le mettre en doute, ce qui est surprenant étant donné le manque d'informations au sein de l'article d'origine (25, 35, 48, 54).

A la différence des espèces humaine et bovine, la transmission verticale des mycoplasmes et leur pathogénicité chez la chienne gestante restent encore à démontrer. Il serait plus probant de rechercher en premier lieu la présence de ces bactéries au sein de la rate et du foie des avortons fraîchement autopsiés car ces organes ne sont pas contaminés par la flore génitale lors du passage de la filière pelvienne. La présence du genre *Mycoplasma* ou *Ureaplasma* en culture dans ces organes prouverait à la fois la transmission verticale de ces Mollicutes et leur participation aux interruptions tardives de gestation. L'étiologie des phénomènes de mortalité embryonnaire précoce et de résorption fœtale est plus délicate à investiguer. L'observation du développement embryonnaire canin *in vitro* en présence de mycoplasmes pourrait contribuer à cette étude.

## 5. Mycoplasmes et infections néonatales

### a) Chez le nouveau né

La contamination du nourrisson par *Ureaplasma urealyticum* ou/et par *Mycoplasma hominis* s'effectue surtout à partir du tractus urogénital de la mère et est favorisée par une chorioamniotite et par la rupture des membranes. Une contamination post natale horizontale ou nosocomiale est possible mais ce mode de transmission est plus rare (3). Le taux de transmission est élevé : il s'échelonne entre 45 et 66 % en période post natale (3, 41). Chez le prématuré, ce taux égale 58 % en moyenne. Le pathogène est notamment isolé dans les prélèvements gastriques et pharyngés du nourrisson. *Ureaplasma urealyticum* sous l'appellation regroupant deux biovars est l'espèce de mycoplasme prédominante dans le vagin. C'est aussi logiquement l'espèce la plus représentée chez le nourrisson (3).

Les affections néonatales répertoriées impliquent *Ureaplasma urealyticum* le plus fréquemment. Le phénomène de mortalité néonatale n'est pas évoqué dans la littérature décrivant les mycoplasmoses humaines (41).

*Ureaplasma urealyticum* provoque une leucocytose sanguine et une granulocytose en l'absence d'infection lors de la première semaine de vie (3). Des pneumopathies s'accompagnant d'une opacification interstitielle et d'une leucocytose peuvent survenir. Ces signes n'étant pas spécifiques, l'isolement de l'uréaplasme dans un prélèvement laryngo-pharyngé confirme alors le diagnostic.

Les deux Mollicutes ont aussi été isolés dans le liquide céphalorachidien de nourrissons atteints de méningites ou de méningo-encéphalites (6, 41). Le pathogène le plus fréquent était cette fois-ci *Mycoplasma hominis* et la plupart des nouveaux-nés étaient prématurés.

Des adénites, des abcès du scalp ou du cerveau sont aussi des localisations pour lesquelles un mycoplasme d'origine « génitale » a été isolé.

Les autres affections du nouveau né telles que la dysplasie broncho-pulmonaire et la leucomalacie périventriculaire (LMPV) sont encore discutées (3, 41).

La dysplasie broncho-pulmonaire est caractérisée par une oxygénodépendance entre la quatrième et la 36<sup>ième</sup> semaine de vie et toutes les études ne signalent pas de différence significative entre le taux de dysplasie broncho-pulmonaire chez les nourrissons colonisés par les mycoplasmes et celui des autres nourrissons.

La leucomalacie périventriculaire est une maladie dont la pathogénicité est à la fois vasculaire et inflammatoire. La nécrose de la substance blanche périventriculaire est responsable de lésions ischémiques du cerveau, ce qui occasionne des déficits et des retards psychomoteurs. On suspecte aujourd'hui *Ureaplasma urealyticum* de générer des LMPV dans la mesure où il entraîne une cascade inflammatoire avec sécrétions d'interleukine 6 et de TNF après invasion du liquide amniotique. En effet, l'augmentation du taux d'interleukine 6 dans le liquide amniotique provoque une augmentation de l'incidence des hémorragies intra-ventriculaires et des leucomalacies périventriculaires (3).

#### **b) Chez le veau**

L'impact d' *Ureaplasma diversum* sur les infections respiratoires du jeune est moins bien étudié que dans le cas des troubles de la reproduction des adultes. Cependant, il est le deuxième agent représenté parmi les Mollicutes après *Mycoplasma dispar* dans les infections respiratoires des jeunes veaux six à 21 jours après la mise en lot (9). L'inoculation expérimentale reproduit les signes cliniques de bronchopneumonie mais l'implication de la transmission verticale lors d'infection naturelle est insuffisamment documentée.

#### **c) Chez le chiot**

Hormis le syndrome décrit par LEIN précédemment, les infections néonatales du chiot dues aux mycoplasmes restent un domaine peu exploré (48).

Il est malgré tout logique de supposer que le chiot puisse développer une mycoplasmosé néonatale suite à une contamination oropharyngée durant la mise-bas, au même titre que le nouveau né chez l'espèce humaine. Les prélèvements gastriques et pharyngés sont indiqués même si ils s'avèrent coûteux à l'échelle d'un élevage et plus difficiles à mettre en œuvre dans l'espèce canine.

En cas de pneumopathie néonatale fatale, l'isolement des mycoplasmes dans le poumon est le prélèvement de premier choix. La contamination peut néanmoins aussi bien résulter d'une contamination oropharyngée pendant le passage de la filière pelvienne que d'une transmission verticale au fœtus car les deux origines sont possibles d'après les données obtenues dans les espèces humaine et bovine.

Aujourd'hui, les mycoplasmes ne sont plus considérés comme de simples bactéries commensales des muqueuses génitales mais comme des agents pathogènes opportunistes. On leur reconnaît les propriétés suivantes : l'exploitation de cellules hôtes, l'hypervariabilité antigénique, une action immunomodulatrice et la capacité d'infecter les voies urogénitales supérieures.

En l'absence de méthode standardisée de dénombrement quantitatif, les informations actuelles reposent sur l'association statistique entre une affection et l'isolement d'une espèce ou d'un genre de mycoplasme au sein d'un tissu ou d'une muqueuse.

Néanmoins, les informations collectées en reproduction bovine et humaine sont plus consistantes que dans l'espèce canine où les conclusions émises sur la pathogénicité des mycoplasmes ne sont pas toujours argumentées. L'ensemble des motifs de suspicion d'une infection liée aux mycoplasmes dans l'espèce canine regroupe actuellement l'infertilité, les vaginites, les endométrites, les avortements et la mortinatalité, ainsi que les balanoposthites, les orchépididymites et les prostatites (16, 25, 48, 49, 51, 54, 55, 74, 76). L'influence des mycoplasmes et en particulier du genre *Ureaplasma* sur les interruptions de gestation, sur les affections génitales hautes et sur la qualité du sperme est encore peu connue et mérite de plus amples recherches.



### **III. Diagnostic et traitement des mycoplasmoses en reproduction**

#### **A. Diagnostic des infections provoquées par les mycoplasmes**

##### **1. Diagnostic différentiel des mycoplasmoses urogénitales**

###### **a) Dans l'espèce humaine**

Les urétrites masculines sont classées en deux catégories : les urétrites gonococciques dues à *Neisseria gonorrhoeae*, et les urétrites non gonococciques. Les pathogènes responsables d'urétrite non gonococcique à l'exception des mycoplasmes sont : *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* et *Candida albicans* (39, 44).

Chez la femme, les pathogènes constituant le diagnostic différentiel des mycoplasmoses sont ceux à l'origine de vaginoses bactériennes ou pouvant conduire à des avortements spontanés. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* et *Trichomonas vaginalis* en sont les représentants les plus recherchés. Des bactéries entériques et des candidoses pourraient aussi être impliquées (23, 42).

###### **b) Dans l'espèce bovine**

La rhinotrachéite infectieuse bovine ou IBR est responsable de l'apparition d'une vulvite granuleuse mais cette forme clinique ne serait pas présente en France. Les nombreux agents infectieux occasionnant des troubles de la fertilité ou des pneumopathies chez le veau et présentés au tableau 6 font partie du diagnostic différentiel.

Tableau 6 : Diagnostic différentiel des troubles de la reproduction et des affections néonatales provoqués par les mycoplasmes chez l'espèce bovine. D'après Bey (9)

|              | <u>Agents responsables d'infertilité</u>                                                                                                                                                                    | <u>Agents responsables de pneumopathies chez le veau</u>                                                              |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bactéries    | <i>Brucella abortus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Coxiella burnetti</i> , <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Campylobacter fetus</i> , <i>Chlamydophila abortus</i> , <i>Salmonella enterica</i> | <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Actinomyces pyogenes</i> , <i>Histophilus somni</i> |
| Virus        | IBR, maladie des muqueuses, herpes virus de type 1                                                                                                                                                          | Virus respiratoire syncytial bovin, virus para influenza 3, virus de la BVD, coronavirus, adénovirus                  |
| Protozoaires | <i>Neospora caninum</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>                                                                                                                                                          |                                                                                                                       |
| Champignons  | <i>Aspergillus fumigatus</i>                                                                                                                                                                                |                                                                                                                       |

### c) Dans l'espèce canine

Le diagnostic différentiel des mycoplasmoses génitales canines est large. La brucellose canine à *Brucella canis* et l'herpesvirose provoquent des manifestations cliniques très proches de celles imputées aux mycoplasmes, c'est pourquoi nous évoquerons les techniques pouvant permettre de les mettre en évidence ou de les exclure en parallèle du diagnostic d'une mycoplasmosé.

#### (1) Pathologie infectieuse

##### (a) Brucellose

##### (i) Manifestations cliniques

La brucellose canine à *Brucella canis* occasionne de l'infertilité et des avortements. Les symptômes présents chez la femelle sont l'interruption de gestation à deux semaines du terme, la présence de mort-nés, de fœtus autolysés, de chiots momifiés, les difficultés à mettre bas et la mortalité néonatale. L'expression de l'oestrus n'est pas modifiée (37). Chez le mâle, l'orchi-épididymite, une dermatite scrotale, l'altération du spermogramme sont des signes



évocateurs de brucellose. Le spermogramme peut révéler une oligozoospermie, une tératozoospermie, une azoospermie ou une oligo-asthéo-tératozoospermie (OAT) (37).

(ii) Diagnostic

La sérologie est positive à partir de huit à dix semaines après contamination par *Brucella canis* (25, 37). Plusieurs tests sont disponibles (25, 37).

L'isolement de *Brucella canis* procure un diagnostic définitif. Sur animal vivant, les prélèvements de choix sont les écoulements vaginaux, le placenta, le sperme, la fraction prostatique si elle est individualisée, l'urine et le sang (25, 37). Lors de l'autopsie d'un avorton ou d'un mort-né, les viscères et les enveloppes placentaires sont à envoyer pour analyse bactériologique. L'amplification de l'ADN brucellique est considérée comme la méthode de choix.

(b) Herpesvirose

(i) Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques chez la femelle sont constituées par les avortements survenant durant les deux derniers tiers de gestation, la mortinatalité, l'infertilité après accouplement et les lésions vulvaires prenant l'aspect de vésicules (14, 25, 70, 83, 95). Chez le mâle, les lésions attendues sont l'hyperhémie et la présence de nodules lymphoïdes sur le pénis et le prépuce (25, 83). La mortalité néonatale affecte les chiots âgés de moins de trois semaines (25, 70, 83).

(ii) Diagnostic

Les corps d'inclusion intranucléaires associés aux foyers de nécrose dans le foie, les reins, la rate, les noeuds lymphatiques et le placenta sont pathognomoniques (25, 83).

La sérologie s'utilise pour détecter les porteurs latents et les adultes infectés d'un élevage. L'interprétation d'un test négatif doit s'effectuer avec précaution car les anticorps neutralisants synthétisés sont décelables pendant une courte période égalant 60 jours (25, 83).

La PCR est un examen rapide et fiable. Tous les organes de l'avorton ou du chiot, ainsi que les annexes placentaires, peuvent être testés (25).

### (c) Autres maladies infectieuses

- Avortements bactériens non brucelliques

*Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* et les streptocoques des groupes G et L sont souvent isolées à partir de la muqueuse vaginale de chiennes ne présentant pas de trouble de la reproduction (27, 51, 65). Elles jouent ici le rôle de pathogène opportuniste. Les genres *Listeria*, *Salmonella*, *Leptospira* et *Campylobacter jejuni* n'appartiennent pas à la flore vaginale des chiennes saines : ce sont donc des pathogènes spécifiques (51).

- Avortements d'origine virale

Les infections par le virus de la maladie de Carré et par l'adénovirus de l'hépatite de Rubarth de chiennes gestantes sont susceptibles de provoquer des avortements (27, 65).

- Avortements parasitaires

Le chien est un hôte intermédiaire de *Toxoplasma gondii*. Ce pathogène est capable de traverser la barrière placentaire chez la chienne gestante, et l'infection *in utero* se traduirait par des avortements tardifs (27, 65).

La transmission verticale de *Neospora caninum* est suspectée mais il est difficile d'éliminer les infections post-natales lors d'étude rétrospective car le dosage des anticorps doit avoir lieu avant la buvée du colostrum ou bien à cinq semaines d'âge (5, 27).

## (2) Pathologie endocrinienne

Toutes les affections endocriniennes à l'origine d'une interruption de gestation ou d'un échec de la fécondation sont concernées.

L'hypothyroïdie peut être soupçonnée lorsqu'une femelle reste en anoestrus (30). Son influence en reproduction est controversée car de nombreux males hypothyroïdiens ont une fertilité normale. La sécrétion excessive de prolactine par absence de rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire est une explication possible des conséquences de l'hypothyroïdie sur la fertilité (34).

L'incidence des kystes et des tumeurs ovariennes est plus importante chez les femelles âgées. La présentation clinique dépend des hormones secrétées. Le diagnostic est établi par échographie ovarienne (30, 69).

L'insuffisance lutéale est caractérisée par une sécrétion insuffisante de progestérone durant la gestation. Normalement, la progestéronémie chute brutalement à moins de 1 ng/ml 24 heures avant la mise bas (71). Lorsque la concentration sérique en progestérone est inférieure à 6 nmol/l pendant plusieurs jours, le risque d'avortement est élevé. Le traitement recommandé pour l'insuffisance lutéale est une supplémentation en progestagènes qui doit être stoppée au 58<sup>ème</sup> jour de gestation pour minimiser les risques de retard à la mise bas, de dystocie et de pyomètre (33).

## **2. Prélèvements et méthodes d'identification actuelles**

En gynécologie et en urologie humaines, les méthodes choisies sont celles permettant la mise en évidence directe du mycoplasme ou de ses constituants. Les anticorps anti-mycoplasmes peuvent être mesurés mais la sensibilité est faible lorsque la localisation du Mollicute est superficielle (41).

Chez le chien, la sérologie est pour l'instant réservée aux études expérimentales telles que la mise en évidence d'une séroconversion chez de jeunes chiens infectés par *Mycoplasma cynos* (80).

### **a) Dans l'espèce humaine**

Les échantillons sont prélevés chez la femme au niveau de la région endo-cervicale après un nettoyage du mucus exocervical à l'aide d'écouvillons stériles mais sans faire usage d'antiseptique local (23, 44). Lorsque la patiente est enceinte, l'échantillon est recueilli à partir du fornix vaginal postérieur avec un écouvillon stérile une fois le spéculum mis en place (42).

Les autres sites habituellement prélevés chez la mère sont le placenta et le liquide amniotique (3). Chez le nouveau né, le prélèvement gastrique est de mise. La recherche peut aussi s'effectuer sur le pharynx et la trachée si l'enfant est intubé (3). Les recherches effectuées après la première semaine de vie sont utiles dans la mesure où la colonisation peut être minimisée le jour de la naissance (3).

Chez l'homme, l'obtention d'échantillons urétraux est précédée par un nettoyage du méat urinaire externe sans usage d'antiseptique local. Un écouvillon est ensuite introduit sur une longueur de 2 à 3 cm à l'intérieur de l'urètre et tourné contre la paroi pour recueillir le maximum de cellules possible (44).

Lors d'infection du tractus urinaire chez l'homme, l'échantillon optimal dépend de la méthode employée par le laboratoire lors de l'isolement : il s'agit soit d'un écouvillon urétral, soit des premières urines recueillies (78). Chez la femme, on associera un écouvillon cervical à l'échantillon urinaire afin d'augmenter la sensibilité du test (78).

Des kits commerciaux sont disponibles pour l'isolement et l'identification des espèces de mycoplasmes génitaux chez l'homme. Certains fournissent une estimation de la quantité prélevée du mycoplasme recherché, et notamment si sa concentration dépasse  $10^4$  cfu/ml (3, 44). L'antibiosensibilité de la souche à l'égard de certains macrolides, certaines tétracyclines et certaines fluoroquinolones peut aussi être estimée à l'aide de ces kits (44). Quelques auteurs reprochent le manque de sensibilité de ces kits commerciaux (78).

Une partie des hôpitaux travaille en collaboration avec des laboratoires spécialisés dans la culture de mycoplasmes, chez qui le prélèvement est envoyé dans le milieu de transport indiqué. D'autres laboratoires utilisent la PCR spécifique d'espèce pour identifier les mycoplasmes, par exemple à l'aide de la technique d'hybridation oligonucléotidique effectuée

sur plaque microtitrée (3, 42). La technique de quantification des mycoplasmes au sein des cellules infectées par PCR en temps réel est en développement (11).

La PCR a une sensibilité supérieure à celle des cultures : 40 % des cultures négatives à partir de liquide amniotique se révèlent positives par PCR et *Mycoplasma genitalium* est mis en évidence par PCR car difficile à cultiver. Néanmoins, la PCR est à ce jour moins utilisée que les cultures (3, 6, 41).

#### **b) Dans l'espèce bovine**

Le placenta, les poumons et le contenu stomacal de l'avorton doivent faire l'objet de prélèvements en cas d'avortement (9). La muqueuse vaginale est écouvillonnée en cas de vulvite granuleuse. Les milieux de transport préconisés sont par exemple les milieux de Stuart ou de Amies sans charbon. Des milieux de transport plus spécifiques du genre *Ureaplasma* sont disponibles : A3B, Remel, Lexena, KS (9).

L'isolement qualitatif du genre *Ureaplasma* par PCR est disponible au Brésil et s'avère plus sensible que la culture bactérienne, ce qui concorde avec la littérature disponible dans l'espèce humaine (9). De plus, la technique PCR permet de s'affranchir des milieux de transport spécifiques qui sont nécessaires lorsque la culture est requise (9).

#### **c) Dans l'espèce canine**

L'écouvillon vaginal est le moyen de diagnostic préconisé en cas de vaginite chez la chienne. Les organes du tractus génital supérieur comme l'utérus, l'oviducte et les ovaires seront prélevés si possible (51). Le passage du col de l'utérus à l'aide d'une sonde endoscopique couplé à un rinçage de la muqueuse endométriale est un prélèvement moins invasif que la biopsie, mais le risque d'une contamination par la flore commensale vaginale est à prendre en compte.

Lorsqu'une bactériologie classique est réalisée, on effectuera un deuxième écouvillonnage dédié à la seule recherche des mycoplasmes car leurs conditions de culture sont spécifiques (51).

Avant de procéder au prélèvement, une désinfection de la vulve est effectuée avec de l'éthanol titré à 70 % (51, 54). Après évaporation, un spéculum stérile ou un tube de protection de l'écouvillon est introduit entre les lèvres vulvaires (25, 51, 54). Cacher l'écouvillon est essentiel pour que l'échantillon ne soit pas souillé par la jonction vestibulo-vulvaire naturellement riche en mycoplasmes (54).

En fonction du type de recherche (culture classique ou PCR), on prendra soin d'humidifier l'écouvillon et de l'acheminer dans le milieu de transport adéquat en fonction des recommandations émises par le laboratoire (51, 54).

La PCR qualitative est une technique en cours de développement. Certains laboratoires identifient seulement le genre du mycoplasme prélevé sachant qu'une spéciation est déjà possible pour certaines espèces. L'intérêt de cette technique est limité dans la mesure où l'isolement qualitatif des mycoplasmes ne permet pas de s'orienter lorsque l'on cherche à déterminer si la bactérie est commensale ou pathogène. La PCR quantitative remplacera très probablement la culture bactérienne une fois validée.

Le laboratoire d'études des mycoplasmes de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon effectue un dénombrement semi quantitatif des Mollicutes cultivés. L'écouvillon doit être transporté dans un tube de milieu portant la référence 079037P et commercialisé par le laboratoire AXCELL Biotechnologies. L'acheminement doit être conduit en 24 heures.

Chez le mâle, une spermoculture effectuée sur la fraction spermatique peut être proposée (25, 54). En cas d'avortement ou de mortinatalité, une recherche sur le foie, la rate ou l'estomac des avortons et des chiots décédés est indiquée car la présence de mycoplasmes au sein d'organes internes est considérée comme significative (25, 51, 54)

### **3. Interprétation du résultat**

L'interprétation du résultat en fonction du dénombrement bactérien ne fait pas l'objet de publication récente dans l'espèce bovine. Cette espèce ne sera pas évoquée dans le paragraphe suivant.

#### **a) En fonction du lieu de prélèvement**

##### **(1) Dans l'espèce humaine**

Chez la femme, les mycoplasmes sont commensales des muqueuses vaginale et cervicale externe mais il n'en est pas de même pour l'appareil génital supérieur où ils sont absents chez la patiente saine. Un isolement à partir du tractus génital supérieur est donc considéré comme anormal (41). La mise en évidence au sein du liquide amniotique augmente le risque d'accouchement prématuré, de chorioamniotite et de morbidité périnatale (42).

##### **(2) Dans l'espèce canine**

Les mycoplasmes sont considérés comme des bactéries commensales des muqueuses mais ne colonisent pas les organes internes d'un animal sain. C'est pourquoi l'isolement à partir d'organes internes chez l'avorton (foie, rate, contenu stomacal) est un argument fort pour démontrer la participation des mycoplasmes lors de troubles de la reproduction. Le raisonnement est semblable pour l'utérus, l'oviducte et les ovaires de la chienne qui sont normalement exempts de mycoplasmes. Les enveloppes fœtales et le placenta peuvent être contaminés par la flore des voies génitales basses au moment de l'avortement : le crédit accordé à un isolement au sein de ces tissus est donc moins important (25, 51, 54).

## **b) En fonction du dénombrement bactérien**

### **(1) Dans l'espèce humaine**

Chez l'homme et la femme, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus mais des concentrations supérieures à  $10^4$  ucc/ml sont considérées comme significatives (41). La corrélation entre ce seuil et la pathogénicité des mycoplasmes n'est pas étayée.

### **(2) Dans l'espèce canine**

Le dénombrement des mycoplasmes est rarement mené lors du diagnostic et le seuil de pathogénicité est rarement évoqué dans la littérature. MIMOUNI cite le seuil de  $10^6$  ufc/ml au delà duquel les mycoplasmes seraient à l'origine de troubles de la reproduction lorsque le dénombrement est réalisé à partir d'un écouvillon vaginal. Sous  $10^4$  ufc/ml, les Mollicutes n'engendreraient pas d'affection. Entre ces deux seuils, la participation des mycoplasmes dans l'infertilité est décrite comme incertaine (51, 54). On peut toutefois mettre en doute la pertinence de l'utilisation de ces seuils car ils sont issus d'une étude dont la parution n'a pas eu lieu.

La présence de mycoplasmes en culture pure est un élément significatif (93). Il faut donc associer à toute culture de mycoplasmes une culture bactériologique classique pour faciliter l'interprétation (25, 51, 54, 93).

## **B. Traitement des mycoplasmoses**

### **1. Antibiosensibilité naturelle des mycoplasmes**

Les macrolides et apparentés, les tétracyclines et les fluoroquinolones sont les trois familles d'antibiotiques les plus usitées dans le traitement des mycoplasmoses humaines et vétérinaires



(31). Elles permettent l'obtention de concentrations intracellulaires élevées, ce qui est un avantage lorsque l'infection se propage dans les organes internes (68).

Toutefois, seules les fluoroquinolones sont bactéricides (6, 68).

L'usage d'aminoglycosides et de chloramphénicol est aussi documenté mais controversé (9, 31, 68, 76).

Dans la majorité des infections bactériennes plus classiques, l'isolement du pathogène s'accompagne de la réalisation d'un antibiogramme qui influence la conduite à tenir du clinicien. Celui-ci veille à utiliser un antibiotique pour lequel le germe est défini comme sensible. Malheureusement, la réalisation d'antibiogrammes suite à l'isolement de mycoplasmes est encore très rare en médecine vétérinaire car les protocoles ne sont pas standardisés et restent à perfectionner (36). La diversité des milieux requis et les difficultés rencontrées pour calibrer un inoculum sont les principales causes impliquées dans ce retard (36).

En médecine humaine, des trousse sont commercialisées mais elles nécessitent de calibrer l'inoculum et donc d'effectuer une primoculture (68). Le matériel composant ces trousse et le mode d'emploi de celles-ci n'est pas décrit par RODRIGUEZ *et al.* (68).

#### **a) Obtention d'un antibiogramme**

##### **(1) Dans l'espèce humaine**

Les techniques pour obtenir l'antibiogramme d'une espèce de mycoplasmes en médecine humaine s'éloignent des conditions habituellement définies pour les autres bactéries et sont très semblables à celles citées dans le paragraphe suivant, ce qui est logique puisque les recommandations vétérinaires découlent des techniques appliquées dans les laboratoires de médecine humaine (68).

La définition de la concentration minimale inhibitrice (ou CMI) pour les mycoplasmes est la suivante : c'est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe de façon visible la

croissance ou le métabolisme de l'espèce testée après une période d'incubation optimale in vitro (36). La CMM ou concentration minimale mycoplasmicide est la plus petite concentration d'agent antimicrobien qui empêche la croissance après application de l'antibiotique et transfert sur un nouveau milieu. La CMI est généralement utilisée pour évaluer la sensibilité des espèces de mycoplasmes à l'égard de diverses familles d'antibiotiques (36).

- Milieux utilisés

En raison de la petite taille des colonies et de la durée parfois longue d'incubation, la méthode de diffusion en milieu gélosé n'est pas conseillée. Seules les méthodes de dilution sont utilisables, effectuées en milieu gélosé ou liquide tout comme pour les mycoplasmes d'intérêt vétérinaire. La méthode de dilution en milieu gélosé a l'avantage de permettre l'étude d'un grand nombre de souches et est conseillée pour les espèces du genre *Mycoplasma* donnant des colonies facilement observables à la loupe binoculaire. La méthode de dilution en milieu liquide, adaptée à l'étude d'*Ureaplasma*, autorise l'étude de la bactéricidie des antibiotiques en plus de la détermination de la CMI (68).

Le milieu gélosé conseillé pour la culture du genre *Mycoplasma* est toujours le milieu de Hayflick modifié. Le milieu H agar en est une variante : il est proposé pour *Mycoplasma hominis*. Les milieux gélosés applicables à *Ureaplasma urealyticum* sont les milieux U agar et A8.

Les milieux liquides indiqués pour *Mycoplasma* sont les milieux de Hayflick modifié et SP-4. Les bouillons de Shepard qui renferment du rouge de phénol, de l'urée et du bleu de bromothymol détectent l'alcalinisation du milieu engendrée par *Ureaplasma urealyticum*.

- Standardisation de la taille de l'inoculum

La taille de l'inoculum conseillée est  $10^4$  à  $10^5$  unités de changement de couleur pour le genre *Mycoplasma* et  $10^3$  à  $10^4$  unités de changement de couleur pour le genre *Ureaplasma*.

- Procédures d'obtention des CMI

L'incubation se fait à 37°C, sous 5 % de CO<sub>2</sub>, après avoir effectué une primoculture de la bactérie pour éviter le mélange des souches. De façon analogue, la CMI finale correspond à la lecture obtenue après une incubation prolongée. L'interprétation de la sensibilité aux antibiotiques tient compte de la CMI initiale. Le tableau 7 relate les CMI obtenues à l'égard des trois espèces suivantes : *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *U. urealyticum*.

Tableau 7 : Ecart des CMI (mg/ml) de différents antibiotiques vis-à-vis des mycoplasmes pathogènes pour l'homme. D'après Rodriguez *et al.* (68).

| Antibiotique    | <i>M. pneumoniae</i> | <i>U. urealyticum</i> | <i>M. hominis</i> |
|-----------------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| Doxycycline     | 0,01-0,02            | 0,02-32               | 0,02-16           |
| Minocycline     | 0,01-0,02            | 0,02-32               | 0,02-16           |
| Erythromycine   | 0,03-0,06            | 0,5-4                 | ≥ 128             |
| Clarithromycine | 0,05                 | 0,02-0,2              | 16-128            |
| Azythromycine   | ≤ 0,01               | 0,5-4                 | [4-64]            |
| Josamycine      | ≤ 0,01-0,02          | 0,1-1                 | 0,05-1            |
| Lincomycine     | [4-8]                | 8-256                 | 0,2-1             |
| Pristinamycine  | 0,02-0,05            | 0,1-1                 | 0,1-0,5           |
| Pefloxacin      | 2                    | 0,5-8                 | 0,5-2             |
| Ciprofloxacine  | 1                    | [1-16]                | 0,1-1             |
| Ofloxacine      | 0,05-1               | 0,2-2                 | 0,2-2             |
| Sparfloxacine   | 0,1                  | 0,1-0,5               | ≤ 0,01            |

## (2) Dans les espèces d'intérêt vétérinaire

Les divers besoins nutritionnels et les conditions de cultures variées des mycoplasmes ont freiné le développement d'un test universel de détermination de la CMI. Il n'existe actuellement aucune procédure standardisée dans le cas des mycoplasmes d'intérêt vétérinaire. Toutefois, des recommandations ont été établies afin d'obtenir des cultures optimales, une croissance sub-optimale pouvant mener à des CMI faussement abaissées et donc erronées (36).

- Milieux utilisés

Parmi les divers milieux utilisés pour l'isolement des mycoplasmes, les milieux les plus probants pour le calcul des CMI des bactéries du genre *Mycoplasma* sont les suivants : le milieu modifié de type B de Hayflick, le milieu de Frey, le milieu de Friis, d'Edward, ainsi que les milieux appelés GS, *Mycoplasma* enrichment broth et ME (36).

Le milieu modifié de type B de Hayflick autorise la croissance de la plupart des procaryotes des genres *Mycoplasma* et *Acholeplasma*. Les autres ont tendance à favoriser la croissance d'espèces que l'on retrouve chez un hôte particulier. Par exemple, le milieu de Friis est utilisé pour cultiver des mycoplasmes « porcins » tels que *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* (36).

En ce qui concerne les bactéries du genre *Ureaplasma*, les milieux utilisés avec succès sont les milieux U9B et N/HU de Friis.

- Standardisation de la taille de l'inoculum

Les échantillons prélevés contiennent souvent des cultures mixtes de Mollicutes. La morphologie restant un critère insuffisant, l'identification des espèces et leur purification par clonage sont obligatoires.

La concentration recommandée pour l'inoculum bactérien est donc comprise entre  $10^3$  à  $10^5$  colour changing unit par ml (ccu/ml) ou  $10^3$  à  $10^5$  colony forming unit par boîte de Pétri (cfu/plate) (31, 36).

- Procédure d'obtention des CMI

La température de croissance est comprise entre 35 et 37°C. Soit l'atmosphère contient 95% de N<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>, soit elle est anaérobie.

Les boîtes de pétri doivent être correctement séchées avant inoculation pour éviter les contaminations croisées lorsque plusieurs espèces sont testées. Les temps d'incubation sont variables en milieu liquide et déterminés par les changements de couleur du milieu. Les temps d'incubation recommandés en milieu solide sont en général suffisants pour que la croissance

soit adéquate. En milieu liquide, les lectures finales peuvent survenir entre 7 et 14 jours après les lectures des CMI initiales, notamment pour les espèces à croissance lente comme *Mycoplasma hyopneumoniae*. Cette CMI finale sera la CMI retenue (36).

Les annexes 1 et 2 détaillent respectivement les protocoles d'obtention des CMI en milieu solide et liquide.

Les CMI obtenues sont exprimées en microgrammes/ml. Lorsqu'un petit nombre de souches appartenant à une espèce est testée, la CMI indiquée sera constituée par un intervalle, par exemple 0,1 à 10 microgrammes/ml. Lorsque le nombre de souches testées est important, il est utile de déterminer le pourcentage de souches inhibées pour une concentration donnée d'antibiotique. Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont respectivement les concentrations inhibant la croissance de 50 et 90 % des souches testées.

L'intérêt des CMI est de pouvoir prévoir le comportement de l'antibiotique *in vivo* à partir des CMI obtenues *in vitro*. En pratique, on testera l'antibiosensibilité de Mollicutes envers les trois grands groupes naturellement actifs contre ces bactéries, soit les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés, et les tétracyclines (68).

#### **b) Prévision de la sensibilité *in vivo***

La désignation « sensible » à l'égard d'un antibiotique implique que l'infection sera certainement enrayée par l'antibiotique. La désignation « intermédiaire » signifie que la réponse à l'administration de l'antibiotique n'est pas prévisible, hormis si de grandes concentrations peuvent être utilisées ou si le produit se concentre sur le site de l'infection (36).

La prévision du comportement n'est pas aisée car de nombreux facteurs pharmacologiques et microbiologiques sont encore inconnus dans le cas des Mollicutes. Cependant, certains auteurs ont essayé d'établir des tables de prévision *in vivo* en fonction de la CMI déterminée *in vitro* à l'égard d'un antibiotique. Ces tables, présentées sur le tableau 8, sont incomplètes en raison de la quantité de données encore limitée à l'heure actuelle (36).

Tableau 8 : Tables de prévision de la sensibilité des mycoplasmes envers les antibiotiques in vivo en fonction de la CMI obtenue in vitro. D'après Hannan (36).

| espèces de mycoplasmes                                                                                                                                                                           | antibiotique                                                                                                                                                                    | CMI (µg/ml) pour laquelle la sensibilité est attendue                                        | CMI (µg/ml) pour laquelle la bactérie est intermédiaire             | CMI (µg/ml) pour laquelle la résistance est prévue                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| expérience 1* ( <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. iowae</i> , <i>M. meleagridis</i> )                                                                                         | oxytétracycline<br>érythromycine<br>oléandomycine<br>roxithromycine<br>spiramycine<br>lincomycine<br>Josamycine<br>tylosine<br>kitasamycine<br>enrofloxacin<br>acide oxolinique | ≤ 4-8<br>≤ 1-4<br>≤ 1-4<br>≤ 1-4<br>≤ 2-8<br>≤ 2-8<br>≤ 2-8<br>≤ 1<br>≤ 8-17<br>≤ 1<br>≤ 2-4 | ≤ 8<br>≤ 4<br>≤ 4<br>≤ 4<br>≤ 8<br>≤ 8<br>≤ 8<br>≤ 8<br>≤ 17<br>≤ 4 | > 8<br>> 4<br>> 4<br>> 4<br>> 8<br>> 8<br>> 8<br>> 1<br>> 17<br>> 1<br>> 4 |
| Expérience 2 ( <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. flocculare</i> )                                                                                                            | tétracycline<br>chloramphénicol<br>érythromycine<br>clindamycine<br>ofloxacin<br>ciprofloxacin                                                                                  | ≤ 1<br>≤ 4<br>≤ 1<br>≤ 1<br>≤ 1<br>≤ 1                                                       | ≤ 4<br>≤ 8<br>≤ 2<br>≤ 2<br>≤ 4<br>≤ 2                              | ≥ 32<br>≥ 16<br>≥ 4<br>≥ 8<br>≥ 16<br>≥ 16                                 |
| Expérience 3 ( <i>M. bovis</i> , <i>M. dispar</i> , <i>U. diversum</i> )                                                                                                                         | tétracycline<br>chloramphénicol<br>streptomycine                                                                                                                                | ≤ 1<br>≤ 4<br>≤ 4                                                                            | [2-4]<br>8<br>[8-16]                                                | ≥ 8<br>≥ 16<br>≥ 32                                                        |
| Expérience 4 ( <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. iowae</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. agalactiae</i> , <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyosynoviae</i> ) | enrofloxacin<br>oxytétracycline<br>fluméquine<br>tylosine<br>tiamuline                                                                                                          | ≤ 0,5<br>≤ 4<br>≤ 4<br>≤ 1<br>≤ 8                                                            | ≤ 1<br>8<br>8<br>≤ 2<br>-                                           | ≥ 2<br>≥ 16<br>≥ 16<br>≥ 4<br>≥ 16                                         |

### c) Limites de l'utilisation de l'antibiogramme

Le choix d'un antibiotique selon la table de prévision peut aussi s'avérer incertain si la CMI obtenue *in vitro* a été calculée en présence d'un pH éloigné des valeurs observées *in vivo*. Certaines CMI sont multipliées ou réduites de plus d'un facteur dix lorsque le pH varie de 0,5 unité si l'on compare différentes études. Les gammes de pH utilisées gagneraient donc à être standardisées pour faciliter l'interprétation des CMI (43).

### d) Résistance acquise des mycoplasmes

La résistance des mycoplasmes bovins envers les tétracyclines est documentée dans les pays où l'usage de l'oxytétracycline est très répandu, ce qui suggère des résistances acquises (20, 90). La résistance à l'azythromycine, molécule non disponible en médecine vétérinaire, montre par ailleurs que les résistances acquises contre les macrolides peuvent s'exercer envers plusieurs membres de cette même famille (31).

La détermination de la sensibilité de divers spécimen de *Mycoplasma bovis* isolés sur des bovins au CHV de l'université de Montréal a révélé *in vitro* une résistance acquise contre la spectinomycine, l'érythromycine, la clindamycine, l'azythromycine et la tétracycline. Seule l'enrofloxacin, bactéricide, a donné lieu à une CMI inférieure à 0,5 µg/l, limite sous laquelle un Mollicute est habituellement décrété sensible (31). Il est inquiétant de constater que les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> obtenues *in vitro* à l'égard de souches récoltées sur le terrain montrent l'apparition de résistances acquises envers plusieurs familles d'antibiotiques : l'arsenal thérapeutique se réduit alors considérablement.

Les origines de ces résistances acquises sont peu à peu élucidées grâce au séquençage des isolats recueillis. Le mécanisme d'action des macrolides, lincosamides et streptogramines consiste en une inhibition de la synthèse protéique, conséquence de la liaison des antibiotiques aux domaines II et V de l'ARN ribosomal 23 S. Des mutations simples positionnées au sein de la séquence de l'ARN ribosomal 23 S ont été identifiées chez des

isolats résistants à l'ensemble de ces antibiotiques possédant un cycle de 14 ou 15 carbones (62).

Les fluoroquinolones récentes telles que la sparfloxacine et la levofloxacine ont des CMI *in vitro* inférieures à celles de la ciprofloxacine et de l'enrofloxacine (94). Cependant, des mutations au niveau du complexe gyrase/topoisomérase IV de la séquence d'ADN confèrent à certaines souches d'*Ureaplasma* une résistance acquise à l'égard de ces molécules récentes (7, 24).

## **2. Posologie et durée des traitements**

### **a) Recommandations chez l'homme**

Les tétracyclines sont moins actives que les fluoroquinolones et les macrolides pour traiter les mycoplasmoses chez la femme (3, 6, 44). On utilisera donc les fluoroquinolones et les macrolides pour traiter les infections gynécologiques ou urinaires dues à *Ureaplasma spp* et *Mycoplasma hominis*, en évitant l'usage de l'érythromycine ou de l'azithromycine, antibiotiques peu efficaces contre *Mycoplasma hominis* (3, 6, 41). L'administration de ciprofloxacine est recommandée en cas d'atteinte neurologique du nourrisson. A l'inverse de l'érythromycine, la josamycine se révèle une des molécules les plus efficaces parmi les macrolides (3, 44).

En cas d'urétrite non gonococcique due à *Mycoplasma genitalium*, l'administration de macrolides tels que l'azithromycine ou de doxycycline est le traitement choisi en première intention (39, 78). L'azithromycine peut s'administrer en une prise unique de 1000 mg ou bien pendant cinq jours avec une prise de 500 mg le premier jour suivie par 4 prises de 250 mg les jours suivants. Le deuxième schéma thérapeutique semble plus efficace à l'heure actuelle (78). La doxycycline s'administre à raison de deux prises quotidiennes de 100 mg durant sept jours (39). Son efficacité avoisine 95 % et rejoint celle obtenue lors de l'administration d'azithromycine pendant 5 jours (39, 78). Si l'isolat s'avère résister à ces traitements, les fluoroquinolones sont alors préconisées (39, 78). Si l'isolat correspond à



*Mycoplasma hominis* ou *Ureaplasma spp.*, le choix des molécules sera similaire à celui recommandé lors d'infection chez la femme (39).

#### **b) Recommandations chez les bovins**

Les traitements concernant l'espèce bovine ont pour objectif de diminuer le risque de transmission de l'infection au cours de la reproduction assistée (9). L'association d'antibiotiques incluant la gentamycine, la tylosine, la spectinomycine et la lincomycine est notamment utilisée pour le traitement de la semence, des embryons et des ovocytes (9). La posologie et la durée des traitements chez les individus ne font pas l'objet de recommandation particulière.

#### **c) Recommandations chez le chien**

Les recommandations sont en général succinctes. La durée du traitement doit être supérieure à deux semaines (25, 54). Les tétracyclines et les fluoroquinolones ne seront pas utilisées sur les animaux en cours de croissance ou sur les femelles gestantes, tout en gardant à l'esprit que l'érythromycine est inactive contre *Mycoplasma canis* (25, 35, 54, 55).

Il est prudent de répéter la recherche de mycoplasmes en fin de traitement (54). Même si le dénombrement semi quantitatif est disponible, il n'existe toujours pas de critère permettant de différencier à coup sûr un mycoplasme pathogène d'un mycoplasme commensal, ce qui rend difficile la confirmation de la disparition d'une infection vaginale.



## CONCLUSION

La comparaison des données bibliographiques concernant l'incidence des mycoplasmes en reproduction canine, humaine et bovine permet d'observer deux phénomènes : le manque d'informations consacrées à l'espèce canine et la difficulté de diagnostiquer une infection liée aux mycoplasmes quel que soit l'hôte.

Le pouvoir pathogène à l'échelle cellulaire et moléculaire est clairement établi, notamment grâce aux techniques récentes développées à partir de la microscopie électronique. Les capacités d'adhésion et d'invasion cellulaire, d'hypervariabilité antigénique et de modulation de la réponse immunitaire font des mycoplasmes des candidats logiques au titre d'agent pathogène responsable d'infertilité chez le chien.

*Mycoplasma canis*, espèce commensale la plus fréquente au sein des muqueuses génitales de la chienne, est présente en quantité plus abondante chez la chienne présentant des troubles de la reproduction que chez la chienne saine : le rôle exact de cette espèce dans l'infertilité canine gagnerait à être investigué.

De plus, le genre *Ureaplasma* est associé nettement aux troubles de la reproduction chez la femme et chez la vache, le pouvoir pathogène étant facilement reproduit lors d'inoculation expérimentale chez cette dernière. Il serait donc judicieux d'amplifier les recherches portant sur la pathogénicité d'*Ureaplasma canigenitalium* chez l'espèce canine, d'autant plus que la présence du genre *Ureaplasma* sur le prépuce est significativement associée à l'infertilité chez le chien mâle.

Le développement des techniques d'identification génétique telles que la PCR a permis la découverte de nouvelles espèces, l'élaboration de nouvelles classifications et une meilleure détection des mycoplasmes mais il est toujours difficile d'évaluer si une espèce est pathogène, hormis dans le cas d'obtention de cultures pures. Le développement d'une PCR quantitative et un screening effectué chez les patients sains et affectés de troubles de la reproduction seront les deux éléments nécessaires pour estimer quel est le seuil de pathogénicité des Mollicutes dans le tractus urogénital.

Enfin, l'apparition d'antibiorésistances envers les trois principales familles d'antibiotiques actifs contre les mycoplasmes montre l'importance d'une utilisation raisonnée des antibiotiques au sein des élevages canins.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 : ADEGBOYE DS, ADDO PD. Mycoplasmas from vagina of a bitch with open cervix pyometra. *Vet. Record*, 1978, **102**, 62-63.
- 2 : AL-AUBAIDI JM, FABRICANT J. The practical application of immunofluorescence (agar block technic) for the identification of *Mycoplasma*. *Cornell Vet.*, 1971, **61**(3), 519-542.
- 3 : AUJARD Y, MAURY L, DOIT C, MARIANI-KURKDJIAN P, BAUD O, FARNOUX C, BINGEN E. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* et pathologies néonatales: données personnelles et revues de la littérature. *Archives de pédiatrie*, 2005, **12**, 512-518.
- 4 : AYLING RD, BASHIRUDDIN SE, NICHOLAS RAJ. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet. Record*, 2004, **155**, 413-416.
- 5 : BARBER JS, TREES AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 57-64.
- 6 : BEBEAR CM, SCHAEVERBEKE T, BEBEAR C. Les mycoplasmoses humaines. *Le Point Vétérinaire*, 1996, **28**(180), 793-798.
- 7 : BEBEAR CM, RENAUDIN H, CHARRON A, GRUSON D, LEFRANCOIS M, BEBEAR C. In vitro activity of tovaflxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**(9), 2557-2560.
- 8 : BENCINA D, BRADBURY JM. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**(2), 407-410.
- 9 : BEY I. *Les uréaplasmes en pathologie bovine : épidémiologie, diagnostic et mesures de contrôle*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2006, n° 83, 88 p.

- 10 : BHOGAL BS, HANNAN PCT, SMITH D. Production of mycoplasma-specific antiser in rabbits immunologicallytolerized at birth to mycoplasma medium constituents. *Journal of Immunological Methods*, 1987, **97**, 191-199.
- 11 : BLAYLOCK MW, MUSATOVVOVA O, BASEMAN JG, BASEMAN JB. Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**(2), 746-752.
- 12 : BROITMAN NL, FLOYD CM, JOHNSON CA, DE LA MAZA LM, PETERSON EM. Comparison of commercially available media for detection and isolation of *Ureaplasma urealitycum* and *Mycoplasma hominis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**(5), 1335-1337.
- 13 : BRUCHIM A, LUTSKY I. Isolation of mycoplasmas from the canine genital tract: a survey of 108 healthy dogs. *Res. Vet. Sci.*, 1978, **25**, 243-245.
- 14 : BURR PD, CAMPBELL MEM, NICOLSON L, ONIONS DE. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 227-237.
- 15 : BYRNE W, MARKEY B, MC CORMACK R, EGAN J, BALL H, SACHSE K. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Vet. Record*, 2005, **156**, 767-771.
- 16 : CHALKER VJ. Canine mycoplasmas. *Res. Vet. Sci.*, 2005, **79**, 1-8.
- 17 : CHALKER VJ, BROWNLIE J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S r RNA gene and 16S/23S r RNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, **54**, 537-542.
- 18 : CHALKER VJ, OWEN WMA, PATERSON C, BARKER E, BROOKS H, RYCROFT AN, BROWNLIE J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiol.*, 2004, **150**, 3491-3497.
- 19 : CLYDE WA. Mycoplasmas species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immunol.*, 1964, **92**, 958-965.

- 20 : COOPER AC, FULLER JR, FULLER MK, WHITTLESTONE P, WISE DR. In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Res. Vet. Sci.*, 1993, **54**, 329-334.
- 21 : DOIG PA, RUHNKE HL, PALMER NC. Experimental bovine genital ureaplasmosis II. Granular vulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation. *Can. J. Comp. Med.*, 1980, **44**, 259-256.
- 22 : DOIG PA, RUHNKE HL, BOSU WTK. The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 233-238.
- 23 : DONDEERS GGG, VAN BULCK B, CAUDRON J, LONDERS L, VEREECKEN A, SPITZ B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2000, **183**, 431-437.
- 24 : DUFFY L, GLASS J, HALL G, AVERY R, RACKLEY R, PETERSON S, WAITES K. Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**(4), 1590-1592.
- 25 : DUMON C, MIMOUNI P. Mortinatalité en élevage canin liée à des maladies infectieuses: brucellose, herpesvirose, mycoplasmoses. *EMC-Vétérinaire*, 2005, **2**, 54-62.
- 26 : EUZEBY JP. Classification of domains and phyla — Hierarchical classification of prokaryotes. In : EUZEBY JP. *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire*. [en-ligne], Mise à jour le 04 février 2008, [http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html], (consulté le 24 mai 2008).
- 27 : FAVIER F. *Avortements et mortalité néonatale en élevage canin : approche pratique du vétérinaire*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2001, n° 39, 126 p.
- 28 : FIACCO V, MILLER MJ, CARNEY E, MARTIN WJ. Comparison of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, **20**(5), 862-865.
- 29 : FILIOUSSIS G, CHRISTODOULOPOULOS G, THATCHER A, PETRIDOU V, BOURTZI-CHATZOPOULOU E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *The Veterinary Journal*, 2007, **173**, 215-218.

30 : FONTBONNE A. Infertility in the bitch. In: *Proceedings of the 31<sup>st</sup> WSAVA/ 12<sup>th</sup> FECAVA/ 14<sup>th</sup> CSAVA Congress*. Prague, 11-14 octobre 2006, Publisher : International Veterinary Information Service [en-ligne], 2006 (mise à jour le 14 octobre 2006), Ithaca, New York, USA,

[<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture24/Fontbonne1.pdf?LA=1>], (consulté le 22 mai 2008).

31 : FRANCOZ D, FORTIN M, FECTEAU G, MESSIER S. Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Vet. Microbiol.*, 2005, **105**, 57-64.

32 : GOLL F. Identification of Mycoplasmas isolated from domestic animals. In : WHITFORD HW, ROSENBUSCH FF, LAUERMANN LH, ed. *Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis*. 5<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa States University Press, 1994, 15-27.

33 : GORLINGER S, GALAC S, KOOISTRA HS, OKKENS AC. Hypoluteidism in a bitch. *Theriogenology*, 2005, **64**, 213-219.

34 : GRADIL CM, YEAGER A, CONCANNON PW. Assessment of reproductive problems in the male dog. In: CONCANNON PW, ENGLAND G, VERSTEGEN III J, et al.(Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Publisher : International Veterinary Information Service [en-ligne], 2006 (mise à jour le 19 avril 2006), Ithaca, New York, USA,

[<http://www.ivis.org/advances/Concannon/gradil/chapter.asp?LA=1>], (consulté le 22 mai 2008).

35 : GREENE CE. Mycoplasmal, ureaplasma, and L-form infections. In : GREENE CE, ed. *Infectious Diseases of The Dog and Cat*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, 1998, 174-178.

36 : HANNAN PCT. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.*, 2000, **31**, 373-395.

37 : HOLLETT RB. Canine brucellosis : outbreaks and compliance. *Theriogenology*, 2006, **66**, 575-587.



- 38 : HOLZMANN A, LABER G, WALZL H. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the female dog. *Theriogenology*, 1979, **12**, 355-370.
- 39 : ISHIHARA S, YASUDA M, ITO S, MAEDA S, DEGUCHI T. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, **24**, 23-27.
- 40 : JANG SS, LING GV, YAMAMOTO R, WOLF AM. *Mycoplasma* as a cause of urinary tract infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, **185**(1), 45-47.
- 41 : JUDLIN P. Mise au point : mycoplasmes génitaux. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 2003, **31**, 954-959.
- 42 : KATAOKA S, YAMADA T, CHOU K, NISHIDA R, MORIKAWA M, MINAMI M, YAMADA H, SAKURAGI N, MINAKAMI H. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**(1), 51-55.
- 43 : KENNY GE, CARTWRIGHT FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalbapristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbapristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines and quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**(9), 2604-2608.
- 44 : KILIC D, MURAD BASAR M, KAYGUSUZ S, YILMAZ E, BASAR H, BATISLAM E. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2004, **57**, 17-20.
- 45 : KREPLIN CMA, RUHNKE HL, MILLER RB, DOIG PA. The effect of intrauterine inoculation with *Ureaplasma diversum* on bovine fertility. *Can. J. Vet. Res.*, 1987, **51**, 440-443.
- 46 : L' ABEE-LUND TM, HEIENE R, FRIIS NF, AHRENS P, SORUM H. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in Norway. *Vet. Record*, 2003, **153**, 231-235.
- 47 : LABER G, HOLZMANN A. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the male dog. *Theriogenology*, 1977, **7**(4), 177-188.

- 48 : LEIN DH. Canine mycoplasma, ureaplasma, and bacterial infertility. In : Kirk RW : Current Veterinary Therapy IX, Small Animal Practice. Philadelphia : WB Saunders, 1986, 1240-1243.
- 49 : LINDE-FORSBERG C, BOLSKE G. Canine genital mycoplasmas and ureaplasmas. In : BONAGURA JD, Kirk RW, ed. Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice. Philadelphia : WB Saunders, 1995, 1090-1094.
- 50 : LINGWOOD CA, QUINN PA, WILANSKY S, NUTIKKA A, RUHNKE HL, MILLER RB. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. *Biol. Rep.*, 1990, **43**, 694-697.
- 51 : MARTIN O. *La microflore vaginale de la chienne: synthèse bibliographique et étude spéciale de l'infection à Mycoplasma canis*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2001, n° 17, 186 p.
- 52 : MILLER RB, RUHNKE HL, DOIG PA, POITRAS BJ, PALMER NC. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. *Theriogenology*, 1983, **20**(3), 367-374.
- 53 : MILLER R, CHELMONSKA-SOYTA A, SMITS B, FOSTER R, ROSENDAL S. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet. Clin. North. Am. [Food Anim. Pract.]*, 1994, **10**(3), 479-490.
- 54 : MIMOUNI P. Mycoplasmes et pathologie de la reproduction chez le chien. *Le Point Vétérinaire*, 1996, **28**(180), 789-792.
- 55 : MIMOUNI P. Les maladies sexuellement transmissibles : rôle des mycoplasmes. Congrès C.N.V.S.P.A., 1997, **1**, 190-192.
- 56 : NAGAMOTO H, TAKEGAHARA Y, SONODA T, YAMAGUCHI A, UEMURA R, HAGIWARA S, SUEYOSHI M. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 223-232.
- 57 : NICOLSON GL, NASRALLA MY, NICOLSON NL. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infections. *Antimicrobials and infectious diseases newsletter*, 1998, **17**(11), 81-87.

- 58 : PANANGALA VS, WINTER AJ, WIJESIHNA A, FOOTE RH. Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma genitalium*. *Am. J. Vet. Res.*, 1981, **42**(12), 2090-2093.
- 59 : PANANGALA VS, HALL CE, CAVENEY NT, LEIN DH, WINTER AJ. *Mycoplasma bovis* in the upper genital tract of bulls : spontaneous and induced infections. *Cornell Vet.*, 1982, **72**, 292-303.
- 60 : PATAI K, SZILAGYI G, HUBAY M, SZENTMARIAY IF, PAULIN F. Severe endometritis caused by genital mycoplasmas after caesarean section. *J. Med. Microbiol.*, 2005, **54**, 1249-1250.
- 61 : PAUL VK, GUPTA U, SINGH M, NAG VL, TAKKAR D, BHAN MK. Association of genital mycoplasma colonization with low birth weight. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 1998, **63**, 109-114.
- 62 : PEREYRE S, GONZALES P, DE BARBEYRAC B, DARNIGE A, RENAUDIN H, CHARRON A, RAHERISON S, BEBEAR C, BEBEAR CM. Mutations in 23S r RNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. Hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**(10), 3142-3150.
- 63 : POUMARAT F, PERRIN B, LONGCHAMBON D. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, 1991, **29**, 329-338.
- 64 : POUMARAT F, LE GRAND D, BERGONIER D. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Le Point Vétérinaire*, 1996, **28**(180), 761-767.
- 65 : PURSWELL BJ. Differential diagnosis of canine abortion. In : Kirk RW, BONAGURA JD, ed. *Current Veterinary Therapy XI, Small Animal Practice*. Philadelphia : WB Saunders, 1992, 925-929.
- 66 : RANDOLPH JF, MOISE NF, SCARLETT JM, SHIN SJ, BLUE JT, BOOKBINDER PR. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**(3), 387-391.

67 : RHUNKE HL, ROSENDAL S. Useful protocols for diagnosis of animal Mycoplasmas. Addendum I. Media formulations and techniques. In : WHITFORD HW, ROSENBUSCH FF, LAUERMANN LH, ed. *Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis*, 5<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa States University Press, 1994, 141-155.

68 : RODRIGUEZ P, DE BARBEYRAC B, RENAUDIN H, BEABAR C. AntibioGramme des *Chlamydia* et des mycoplasmes. *Revue française des laboratoires*, 1995, **227**, 75-80.

69 : ROMAGNOLI S. Clinical approach to infertility in the bitch. In : *Proceedings of the 28<sup>th</sup> world congress of the World Small Animal Veterinary Association*. Bangkok, Thailand, 24-27 October 2003. Publisher : International Veterinary Information Service [en-ligne], 2003 (mise à jour le 22 mai 2008), Ithaca, NewYork, USA,

[<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAWA2003&PID=pr06693&i0=G> eneric], (consulté le 22 mai 2008).

70 : RONSSE V, VERSTEGEN J, THIRY E, ONCLIN K, AEBERLE C, BRUNET S, POULET H. Canine herpesvirus-1 (CHV-1) : clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*, 2005, **64**, 61-74.

71 : ROOT KUSTRITZ MV. Use of supplemental progesterone in management of canine pregnancy. In: CONCANNON PW, ENGLAND G, VERSTEGEN III J, et al. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Publisher : International Veterinary Information Service [en-ligne], 2001 (mise à jour le 21 avril 2001), Ithaca, NewYork, USA,

[[http://www.ivis.org/advances/Concannon/root/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/advances/Concannon/root/chapter_frm.asp?LA=1)], (consulté le 19 février 2007).

72 : ROOT KUSTRITZ MV, JOHNNSTON SD, OLSON PN, LINDEMAN CJ. Relationship between inflammatory cytology of canine seminal fluid and significant aerobic bacterial, anaerobic bacterial or mycoplasma cultures of canine seminal fluid : 95 cases (1987-2000). *Theriogenology*, 2005, **64**, 1333-1339.

73 : ROSENBUSCH RF. Biology and taxonomy of the mycoplasmas. In : WHITFORD HW, ROSENBUSCH FF, LAUERMANN LH, ed. *Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis*. 5<sup>th</sup> ed. Ames : Iowa States University Press, 1994, 3-11.

- 74 : ROSENDAL S. Canine and feline mycoplasmas. In : TULLY JG, WHITCOMB RF , ed. *The Mycoplasmas, Vol II, Human and Animal Mycoplasmas*. New York : Academic Press AP, 1979, 217-234.
- 75 : ROSENDAL S. Canine mycoplasmas : their ecologic niche and role in disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1982, **180**(10), 1212-1214.
- 76 : ROSENDAL S. Mycoplasmal infections. In GREENE CE : *Infectious Diseases of The Dog and Cat*. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, 1990, 446-454.
- 77 : ROSENDAL S., LEVISOHN S, GALILLY R. Cytokines induced in vitro by *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*, large colony type. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, **44**, 269-278.
- 78 : ROSS JDC, JENSEN JS. *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. *Sex. transm. Inf.*, 2006, **82**, 269-271.
- 79 : ROTTEM S, NAOT Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology*, 1998, **6**(11), 436-440.
- 80 : RYCROFT AN, TSOUNAKOU E, CHALKER V. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. *Vet. Microbiol.*, 2007, **120**, 358-362.
- 81 : SHEPARD MC, LUNCEFORD CD. Differential agar medium (A7) for identification of *ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J. Clin. Microbiol.*, 1976, **3**(6), 613-625.
- 82 : SIRAND-PUGNET P, LARTIGUE C, MAREND A, JACOB D, BARRE A, BARBE V, SCHENOWITZ C, MANGENOT S, COULOUX A, SEGUENS B, DE DARUVAR A, BLANCHARD A, CITTI C. Being pathogenic, plastic and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLOS Genetics*, 2007, **3**(5), 744-758.
- 83 : SMITH KC. Review : herpesviral abortion in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 1997, **153**, 253-268.
- 84 : SPERGSR J, ROSENGARTEN R. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Vet. Microbiol.*, 2007, **125**, 170-174.

- 85 : SPRECHER DJ, COE PH, WALKER RD. Relationships among seminal culture, seminal white blood cells, and the percentage of primary sperm anomalies in bulls prior to the breeding season. *Theriogenology*, 1999, **51**, 1197-1206.
- 86 : STAKENBORG T, VICCA J, VERHELST R, BUTAYE P, MAES D, NAESSENS A, CLAEYS G, DE GANCK C, HAESBROUCK F, VANEECHOUTTE M. Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**(9), 4558-4566.
- 87 : STANBRIDGE E, HAYFLICK L. Growth inhibition test for identification of mycoplasmas species utilizing dried antiserum-impregnated paper disks. *J. Bacteriol.*, 1967, **93**(4), 1392-1396.
- 88 : STROM B, LINDE-FORSBERG C. Effects of ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole on the vaginal bacterial flora of bitches. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**(6), 891-896.
- 89 : SVENSTRUP HF, FEDDER J, ABRAHAM-PESKIR J, BIRKELUND S, CHRISTIANSEN G. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Human Reproduction*, 2003, **18**(10), 2103-2109.
- 90 : TER-LAAK EA, NOORDERGRAAF JH, VERSHURE MH. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, **37**(2), 317-321.
- 91 : THOMSEN AC. Occurrence of mycoplasmas in urinary tracts of patients with acute pyelonephritis. *J. Clin. Microbiol.*, 1978, **8**(1), 84-88.
- 92 : TORTSCHANOFF M, AURICH C, ROSENGARTEN R, SPERGSEER J. Phase and size surface-exposed proteins in equine genital mycoplasmas. *Vet. Microbiol.*, 2005, **110**, 301-306.
- 93 : ULGEN M, CETIN C, SENTURK S, OZEL AE, OZDEMIR U. Urinary tract infections due to *Mycoplasma canis* in dogs. *J. Vet. Med.*, 2006, **45**, 379-382.
- 94 : ULMANN U, SCHUBERT S, KRAUSSE R. Comparative in vitro activity of levofloxacin, other fluoroquinolones, doxycycline and erythromycin against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, **43**, 33-36.

95 : WATT DA, SPRADBROW PB, LAMBERTH JL. Neo-natal mortality of puppies in Queensland caused by canine herpes virus infection. *Australian Veterinary Journal*, 1974, **50**, 120-122.

96 : WENGI N, WILLI B, BORETTI FS, CATTORI V, RIOND B, MELI ML, REUSCH CE, LUTZ H, HOFMANN-LEHMANN R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet. Microbiol.*, 2008, **126**, 132-141.

97 : WHITFORD HW. Isolation of mycoplasmas from clinical specimens. In : WHITFORD HW, ROSENBUSCH FF, LAUERMANN LH, ed. *Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis*. 5<sup>th</sup> ed. Ames : Iowa States University Press, 1994, 12-14.

98 : WHITFORD HW, LINGSWEILER SW. Canine, feline, and equine mycoplasmas. In : WHITFORD HW, ROSENBUSCH FF, LAUERMANN LH, ed. *Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis*. 5<sup>th</sup> ed. Ames : Iowa States University Press, 1994, 134-141.





## **ANNEXES**



Annexe 1 : Protocole d'obtention de la CMI pour une espèce de mycoplasme en milieu solide.  
D'après Hannan (36).

| Etape                                                 | Description                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Préparation de la culture                             | Croissance à 36°C dans 10 ml de milieu contenant les substrats appropriés et un indicateur de pH coloré, changement colorimétrique, addition de glycérol (effet cryoprotecteur) à hauteur de 5% v/v, division en 5 préparations de 1ml stockés à -70°C.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Préparation de l'inoculum                             | Mélange de la préparation de 1ml avec 4 ml du milieu approprié, à pH 7,6 pour les bactéries métabolisant le glucose ou le pyruvate, à pH 6,8 pour les bactéries métabolisant l'arginine, à pH 6,0 pour les bactéries catabolisant l'urée.<br><br>Incubation à 36°C et changement de couleur.<br>Enregistrement du temps nécessaire au changement de couleur.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Détermination de la taille de l'inoculum              | Dilution de 1 ml de l'inoculum préparé avec 9 ml de diluant stérile et centrifugation pendant 5 sec<br>Dilutions décimales en série de $10^{-2}$ à $10^{-9}$ .<br>Transfert de 2 µl de chaque dilution décimale (en trois exemplaires, voire plus si possible) sur la surface d'une boîte d'agar fraîchement préparée et asséchée.<br>Incubation à 36+/- 1°C dans les conditions atmosphériques appropriées sous scellés et en présence de papier humide jusqu'à ce que des colonies soient présentes sur le gel d'agar inoculé avec la plus petite dilution de mycoplasmes.<br>Sélection des boîtes de la même dilution présentant une croissance modérée.<br>Comptage microscopique des colonies produites par chaque inoculum de 2 µl. Le nombre de cfu/plate est la moyenne des 3 comptages précédents.                                                  |
| Préparation de l'inoculum destiné au calcul de la CMI | Préparation d'un inoculum de $10^3$ à $10^5$ cfu/plate à partir du résultat obtenu.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Détermination de la CMI                               | Préparation de deux lots de boîtes de gel d'agar de 9 cm de diamètre, un contenant les antibiotiques aux concentrations à tester, l'autre étant dépourvu d'antibiotique.<br><br>Inoculation de chaque gélose avec 2 µl contenant $10^3$ à $10^5$ cfu, une inoculation multipoint permettant de tester plusieurs souches d'une même espèce.<br><br>Préparation des géloses contrôles, notamment le contrôle de croissance contenant uniquement l'inoculum.<br><br>Incubation à 36+/- 1°C dans des conditions humides jusqu'à obtention d'une croissance visible sous la forme de colonies, soit pendant 7 jours voire plus dans le cas des espèces à croissance lente.<br><br>La CMI finale est la plus petite concentration qui cause plus de 50% d'inhibition de croissance (taille et densité des colonies) en comparaison avec le contrôle de croissance. |



Annexe 2 : Protocole d'obtention de la CMI pour une espèce de mycoplasme en milieu liquide.  
D'après Hannan (36).

| Etape                                                 | Description                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Préparation de la culture                             | Croissance à 36°C dans 10 ml de milieu contenant les substrats appropriés et un indicateur de pH coloré, changement colorimétrique, addition de glycérol (effet cryoprotecteur) à hauteur de 5% v/v, division en 5 préparations de 1ml stockés à -70°C.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Préparation de l'inoculum                             | Mélange de la préparation de 1ml avec 4 ml du milieu approprié, à pH 7,6 pour les bactéries métabolisant le glucose ou le pyruvate, à pH 6,8 pour les bactéries métabolisant l'arginine, à pH 6,0 pour les bactéries catabolisant l'urée.<br><br>Incubation à 36°C et changement de couleur.<br>Enregistrement du temps nécessaire au changement de couleur.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Détermination de la taille de l'inoculum              | Dilution de 1 ml de l'inoculum préparé avec 9 ml de diluant stérile et centrifugation pendant 5 sec.<br>dilutions décimales en série de $10^{-2}$ à $10^{-9}$ .<br>Addition de 0,1 ml de milieu de croissance liquide stérile au pH approprié dans les puits 1 à 8 d'une microplaque.<br>Addition de 0,2 ml de ce milieu stérile dans le puits 12 (puits contrôle).<br>Addition de 0,1 ml de chaque dilution décimale de mycoplasmes dans les puits 8 à 1.<br><br>Pose de scellées sur la microplaque.<br>Incubation à 36 +/- 1°C jusqu'au changement définitif de couleur.<br>Calcul de la taille de l'inoculum: la plus petite dilution $10^{-x}$ montrant un changement de couleur signifie que les 0,1 ml contiennent $10^x$ ccu/ml.<br>L'inoculum non dilué contient donc $10^{x+1}$ ccu/ml.                                                                           |
| Préparation de l'inoculum destiné au calcul de la CMI | Méthode identique à la deuxième étape.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Détermination de la CMI                               | Dilution de l'inoculum de façon à obtenir $10^3$ à $10^5$ ccu/ml.<br>Ajout de des dilutions en séries d'antibiotiques du puits 1 au puits 9.<br>Addition de 0,2 ml de milieu stérile au pH de départ approprié dans le puits 10.<br>Addition de 0,2 ml de milieu stérile au pH de fin d'incubation dans le puits 11.<br>Addition de 0,1 ml de milieu stérile au pH de départ dans le puits 12.<br>Création d'une rangée de séparation contenant 0,1 ml du milieu stérile sans antibiotique.<br>Ajout de 0,1 ml de l'inoculum dans les puits 1 à 9 et 12 (puits 12= puits de contrôle de la croissance).<br>Pose de scellées sur la microplaque.<br>Calcul de la CMI initiale : c'est la plus petite concentration d'antibiotique qui empêche le changement de couleur.<br>Seconde lecture après une réincubation jusqu'à ce que les changements de couleur soient complets. |

