

VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2014 - Thèse n°

***METHODES ALTERNATIVES RAPIDES POUR
L'IDENTIFICATION DES MYCOPLASMES : UNE VOIE
D'AMELIORATION DE VIGIMYC, RESEAU
D'EPIDEMIOSURVEILLANCE DES MYCOPLASMOSES EN
FRANCE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I

(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 1^{er} juillet 2014

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BONNET Sandrine

Née le 24 septembre 1987

À Vienne (38)



VetAgro Sup



VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2014 - Thèse n°

***METHODES ALTERNATIVES RAPIDES POUR
L'IDENTIFICATION DES MYCOPLASMES : UNE VOIE
D'AMELIORATION DE VIGIMYC, RESEAU
D'EPIDEMIOSURVEILLANCE DES MYCOPLASMOSES EN
FRANCE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I

(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 1^{er} juillet 2014

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BONNET Sandrine

Née le 24 septembre 1987

À Vienne (38)



VetAgro Sup



Liste des enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon

Civilité	Nom	Prénom	Unités pédagogiques	Grade
M.	ALOGNINOUWA	Théodore	Pathologie du bétail	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	ARTOIS	Marc	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BARTHELEMY	Anthony	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
Mme	BECKER	Claire	Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	BELLI	Patrick	Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences Contractuel
Mme	BENAHOU-SMITH	Agnès	Equine	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BERTHELET	Marie-Anne	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BOULOCHE	Caroline	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	BOURDOISEAU	Gilles	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	BRUYERE	Pierre	Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Maître de conférences Stagiaire
M.	BUFF	Samuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Maître de conférences
M.	BURONFOSSE	Thierry	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	CACHON	Thibaut	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Stagiaire
M.	CADRE	Jean-Luc	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CALLAT-CARDINAL	Marie-Pierre	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	CAROZZO	Claude	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	CHABANNE	Luc	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	COMMUN	Loic	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	DEMONT	Pierre	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	DESJARDINS PESSON	Isabelle	Equine	Maître de conférences Contractuel
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	ESCRIOU	Catherine	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	FAU	Didier	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	FOURNEL	Corinne	Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Professeur
M.	FRANCK	Michel	Gestion des élevages	Professeur
M.	FREYBURGER	Ludovic	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	FRICHA	Mohamed-Ridha	Pathologie du bétail	Maître de conférences
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	GRAIN	Françoise	Gestion des élevages	Professeur
M.	GRANCHER	Denis	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	GUERIN	Pierre	Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Professeur
Mme	HUGONNARD	Marine	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	JUNOT	Stéphane	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	KECK	Gérard	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	KODJO	Angell	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	LACHERETZ	Antoine	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAMBERT	Véronique	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	LATTARD	Virginie	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
Mme	LÉ GRAND	Dominique	Pathologie du bétail	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	LEPAGE	Olivier	Equine	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	MARCHAL	Thierry	Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Professeur
Mme	MIALET	Sylvie	Santé Publique et Vétérinaire	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
Mme	MICHAUD	Audrey	Gestion des élevages	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Gestion des élevages	Maître de conférences
M.	PEPIN	Michel	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	PIN	Didier	Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PONCE	Frédérique	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PORTIER	Karine	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
Mme	REMY	Denise	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	ROGER	Thierry	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	SABATIER	Philippe	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	SEGARD	Emilie	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
Mme	SERGENTET	Delphine	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	SONET	Juliette	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
M.	THIEBAULT	Jean-Jacques	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences Contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur

A notre Président de jury de thèse

Monsieur le Professeur VANHEMS
Professeur à l'Université Claude Bernard

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

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse

Madame le Docteur BECKER
Professeur à VetAgro Sup Campus Vétérinaire

Pour sa confiance et sa patience dont vous nous avez fait preuve, ainsi que pour votre grande disponibilité, veuillez trouver ici l'expression de notre sincère gratitude pour votre enseignement et de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur BRUYERE
Professeur à VetAgro Sup Campus Vétérinaire

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse. Nous avons apprécié la richesse de l'enseignement que vous nous avez prodigué durant notre scolarité, et votre extrême bienveillance à l'égard des étudiants.

Sincères remerciements.

Madame TARDY
Directrice de l'UMR Mycoplasmoses Anses Lyon

Qui a encadrée et guidée ce travail.

Pour sa disponibilité et son aide.

Qu'elle soit très sincèrement remerciée de son aide et de sa patience.

Aux différents intervenants (Monsieur l'ELEVEUR, Madame LE GRAND, Monsieur DEVILLECHAISE, Madame QUICARD, Madame GAY, Madame TRICOT, Monsieur TERRANOVA)

Pour leur aide et leur gentillesse.

Sincères remerciements.

En hommage à ma grand-mère maternelle,

Auprès de qui j'ai passé mon enfance.

Toi qui m'as inculquée cet amour des animaux et beaucoup d'autres valeurs essentielles.

Sans toi je ne serais pas là.

Tu garderas toujours une place privilégiée dans mon cœur.

A toute ma famille, à mon parrain et à ma marraine,

A mes parents,

Sans qui je ne serais pas là.

Vous avez su me soutenir et m'encourager durant toutes ces longues années d'études.

Ce travail vous est dédié, en témoignage de mon immense affection et de ma reconnaissance.

A mon grand-père paternel,

Avec toute ma tendresse.

A mes cousines Germaine et Nicole,

Sincères remerciements pour votre soutien.

A la mémoire de ma grand-mère paternelle et de mon grand-père maternel.

A la mémoire de Pierrot, Robert et Jean-Louis,

Qui nous ont quittés trop vite.

Vous avez toujours cru en moi, jamais je ne vous oublierai.

A tous mes amis,

Pour tous les bons moments passés et à venir.

Table des matières

Liste des annexes.....	9
Tables des illustrations.....	10
Liste des abréviations.....	13
Introduction.....	15

PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
--	-----------

I. Présentation des mycoplasmes	17
I.1. Taxonomie et morphologie des mycoplasmes	17
I.2. Caractères biologiques et physico-biochimiques	19
II. Mycoplasmoses des ruminants	20
II.1. Principales mycoplasmoses bovines	20
II.1.a. Péripleurmonie contagieuse bovine (PPCB)	20
II.1.b. Affections à <i>Mycoplasma bovis</i> (Mb).....	21
II.2. Principales mycoplasmoses décrites chez les petits ruminants	21
II.3. Agalactie contagieuse des petits ruminants.....	22
II.3.a. Agents étiologiques.....	22
II.3.b. Clinique	23
II.3.c. Épidémiologie.....	24
II.3.d. Diagnostic	27
II.3.e. Traitements	28
II.3.f. Prophylaxie	30
III. Epidémiologie des mycoplasmoses de ruminants en France par le réseau VIGIMYC.....	33
III.1. Intérêt de la surveillance.....	33
III.2. Organisation du réseau	33
III.2.a. Standardisation	34
III.2.b. Méthode d'identification en routine : le Membrane Filtration Dot Immuno-binding (MF-dot)	35
III.2.c. Perspectives d'évolution : Électrophorèse sur gel avec un gradient dénaturant (DGGE)	35

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE	37
---	-----------

Chapitre I : Evaluation de la place des techniques de PCR pour le diagnostic des mycoplasmoses de ruminants dans les laboratoires vétérinaires en France	37
I. Objectifs et contexte	37
II. Matériel et méthodes	38
II.1. Principe	38
II.2. Conduite de l'étude	38

II.2.a. Constitution de l'échantillon.....	38
II.2.b. Informations issues des différentes sources	39
II.2.c. Informations recueillies auprès des laboratoires à l'aide de l'auto-questionnaire	39
II.2.d. Envoi du questionnaire et saisie des informations	40
II.2.e. Mode de tri des données.....	40
II.2.f. Analyses statistiques.....	40
III. Résultats	40
III.1. Analyse des données	40
III.2. Vérification de la qualité des données analysées	42
III.2.a. Taille et représentativité de l'échantillon	42
III.2.b. Traitement des écarts au protocole.....	43
III.2.c. Recherche des perdus de vue par rapport aux « Non Répondants »...43	
III.2.d. Contrôle de cohérence.....	43
III.2.e. Analyse des biais a posteriori.....	45
III.3. Analyse du groupe « Mycoplasmes »	46
III.3.a. Caractéristiques générales.....	46
III.3.b. La rtPCR est-elle utilisée dans les laboratoires pour les analyses mycoplasmatiques ?	49
III.3.c. Quel est le lien avec VIGIMYC ?	52
III.4. Analyse de l'échantillon des laboratoires « Non Mycoplasmes »	55
III.4.a. Quel volume d'analyses traitent les laboratoires ? (Question I.)	55
III.4.b. Sont-ils équipés pour faire de la PCR et/ou de la rtPCR ? (Questions II. et V.).....	56
III.5. Analyse des commentaires	57
IV. Discussion	58
IV.1. Modalités de l'enquête.....	58
IV.2. Résultats.....	58
Chapitre II : Faisabilité et avantage d'un suivi d'élevage par rtPCR	62
I. Objectifs et contexte	62
I.1. Description générale de l'élevage.....	62
I.1.a. Présentation	62
I.1.b. Production laitière et technique de traite	64
I.1.c. Reproduction	65
I.1.d. Etat sanitaire et prophylaxie	65
I.1.e. Motif d'appel : série de mammites.....	66
I.2. Visites réalisées, observations et recommandations	67
I.2.a. Observations des animaux.....	67
I.2.b. Impacts sur la production laitière et le comptage des cellules somatiques	67
I.2.c. Mesures sanitaires et médicales mises en place avant la deuxième visite	69
I.2.d. Prélèvements effectués.....	69

II. Matériel et méthodes	70
II.1. Prélèvements	70
II.2. Analyses en laboratoire	70
II.2.a. Culture et identification par MF-dot	71
II.2.b. Extraction d'ADN et analyse par rtPCR.....	73
II.2.c. Typage des souches par Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA)	74
III. Résultats	74
III.1. Caractéristiques générales de l'échantillon étudié	74
III.2. Interprétation des résultats : définition du statut sanitaire du troupeau en fonction des analyses	76
III.2.a. Lait/Clinique	76
III.2.b. Lait/Traitement antibiotique	77
III.2.c. Oreille/Clinique	77
III.2.d. Oreille/Lait.....	77
III.2.e. Lait/Traitement au tarissement.....	78
III.3. Circulation des souches dans le troupeau	79
IV. Discussion	80
IV.1. Analyse permise par le sous-typage	80
IV.1.a. Sous-espèce (MF-dot)	80
IV.1.b. Clone génétique (MLVA)	80
IV.2. Suivi de l'élevage	81
IV.2.a. Technique d'analyse pour le suivi d'un élevage.....	81
IV.2.b. Mesures sanitaires et médicales mises en place avant le tarissement....	82
IV.2.c. Suivi des animaux après tarissement	82
Chapitre III : Bilan et perspectives	84
CONCLUSION	87
BIBLIOGRAPHIE	89
ANNEXES	101

Table des annexes

Annexe 1 : Fiche technique Méthodes d'analyse en santé animale. Recherche par isolement de <i>Mycoplasma spp.</i> chez les ruminants.....	101
Annexe 2 : Fiche de prélèvements à réaliser dans le cadre d'une recherche de mycoplasme	107
Annexe 3 : Fiche Technique Méthode de transmission des souches de mycoplasmes vers l'Anses Lyon (afin d'assurer leur conservation pendant le transport)	108
Annexe 4 : Fiche VIGIMYC.....	109
Annexe 5 : Lettre d'accompagnement de l'autoquestionnaire envoyé aux laboratoires vétérinaires français.....	110
Annexe 6 : Autoquestionnaire envoyé aux laboratoires vétérinaires français	111
Annexe 7 : Liste des laboratoires d'analyses vétérinaires français, contactés pour l'enquête.....	113
Annexe 8 : Caractéristiques générales du groupe « Mycoplasmes »	117
Annexe 9 : Grille de paiement du lait.....	120
Annexe 10 : Résultats d'analyse du suivi de l'élevage caprin de Rhône-Alpes	121
Annexe 11 : Protocole de typage par VNTR.....	125

Liste des illustrations

Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique de classe des Mollicutes comprenant les espèces dont au moins une séquence de leur génome est disponible.	18
Figure 2. Colonies de <i>Mmc</i>	19
Figure 3. a. Kératoconjonctivite à <i>Ma</i> chez une brebis. b. Polyarthrite et ankylose chez un agneau (à gauche)	24
Figure 4. Voies de pénétration, sites de portages et voies d'excrétion de <i>Ma</i>	26
Figure 5. Plans de lutte nationaux mis en place contre l'agalactie contagieuse de 1966 à aujourd'hui.	32
Figure 6. Echanges entre partenaires du réseau VIGIMYC.....	34
Figure 7. Principe du MF-dot.	35
Figure 8. Evolution sur sept ans du pourcentage de prélèvements reçus par le réseau VIGIMYC selon l'espèce animale	38
Figure 9. Dichotomies permettant la distribution des laboratoires à partir de la source (laboratoires destinataires du questionnaire) en différents échantillons.	42
Figure 10. Réponse donnée à la question III. par les laboratoires à propos de l'envoi des souches en fonction de leur statut au sein de VIGIMYC.....	44
Figure 11. Cartographie de la population des bovins et caprins en 2011 en France et répartition des laboratoires ayant répondu au questionnaire et effectuant des analyses bactériologiques sur des prélèvements provenant de ruminants.....	47
Figure 12. Pourcentage de laboratoires effectuant des analyses bactériologiques et de ceux effectuant des analyses mycoplasmiques en fonction de la filière et du volume d'analyses.	49
Figure 13. Pourcentage de laboratoires utilisant les différentes méthodes d'analyses.	50
Figure 14. Equipement en thermocycleurs du groupe « Mycoplasmes » à gauche et du groupe « Répondants » à droite.	51
Figure 15. Méthodes d'analyses utilisées par les laboratoires en fonction de leur statut au sein de VIGIMYC d'après la base de données du réseau.	53
Figure 16. Pourcentage de laboratoire en fonction de la filière et du volume d'analyses bactériologiques.....	56

Figure 17. Equipement en thermocycleurs des laboratoires du groupe « Non Mycoplasmes » à gauche et du groupe « Répondants » à droite.....	56
Figure 18. Plan des bâtiments de la chèvrerie.....	63
Figure 19. Couloir d'alimentation et lots de chèvres de 1 à 4.	63
Figure 20. Bâtiment des chevrettes.....	64
Figure 21. Salle de traite.....	65
Figure 22. Chevrette présentant un goitre lors de notre première visite du 28 mars 2012.....	66
Figure 23. Différentes manipulations réalisées sur les prélèvements.....	71
Figure 24. Tubesensemencés à l'aide d'écouvillons auriculaires ou avec 200µL de lait.....	72
Figure 25. Gélose sur laquelle ont été isolées les colonies de mycoplasmes contenues dans le lait de la chèvre n°11012.	72
Figure 26. Plaque du MF-dot réalisé le 23 août 2012 (à gauche) et tableau du plan de cette même plaque (à droite).....	73
Figure 27. Typage des souches par MLVA.....	79

Tableaux

Tableau I. Principales mycoplasmoses des petits ruminants, agents étiologiques, principaux symptômes, répartition géographique et prélèvements à effectuer pour leur diagnostic	22
Tableau II. Comparaison entre le MF-dot et la DGGE pour l'identification des mycoplasmes des ruminants	36
Tableau III. Taux cellulaires et variations de production laitière à trois contrôles laitiers des quinze chèvres ayant présenté des mammites avant notre première visite du 28 mars 2012.....	68
Tableau IV. Concordance des résultats obtenus sur les laits en fonction de la technique employée, rtPCR ou culture et identification par MF-dot.....	75
Tableau V. Concordance des résultats obtenus sur les écouvillons auriculaires en fonction de la technique employée, rtPCR ou culture et identification par MF-dot....	75
Tableau VI. Résultats obtenus en rtPCR et comptage des cellules somatiques au contrôle laitier du 13 mars 2012.	76

Liste des abréviations

AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
Bp	Paire de base
BPIE	BronchoPneumonie Infectieuse Enzootique
CAEV	ArthroEncéphalopathie Virale Caprine
CCS	Comptage des Cellules Somatiques
CK	Créatinine Kinase
CL	Contrôle Laitier
Ct	Cycle Threshold
DAB	3,3'-DiAminoBenzidine
ΔCL	Variation du Contrôle Laitier
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMV	Dictionnaire Médicale Vétérinaire
EARL	Exploitation Agricole à Responsabilité Limitée
EILA	Essais InterLaboratoires d'Aptitude
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Gc	Grande colonie
GDS	Groupement de Défense Sanitaire
IC	Intervalle de Confiance
Kb	Kilo Base
Ma	<i>Mycoplasma agalactiae</i>
MALDI TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight
Mb	<i>Mycoplasma bovis</i>
Mcc	<i>Mycoplasma capricolum subspecie capricolum</i>
MF-dot	Dot Immunobinding on Membrane Filtration
MLVA	Multiple Loci VNTR Analysis
Mmc	<i>Mycoplasma mycoides subspecie capri</i>
Mp	<i>Mycoplasma putrefaciens</i>
Mput	<i>Mycoplasma putrefaciens</i>
OIE	Organisation Internationale des Epizootie
OD	Oreille Droite
Pc	Petite colonie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPCB	PériPneumonie Contagieuse Bovine
PPCC	PleuroPneumonie Contagieuse Caprine
PPLO	<i>PleuroPneumoniae</i> Like Organism
RESAPATH	RESeau national de surveillance de l'Antibiorésistance des bactéries PATHogènes animales en France
rtPCR	Polymerase Chain Reaction real time
RtPCR AC	Polymerase Chain Reaction en temps réel pour l'Agalactie Contagieuse
TBS	Tris-Buffered Saline
Te	Taux de laboratoires effectuant des analyses de ruminants
Tm	Taux de laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques de ruminants
Tr	Taux de réponse

Tv	Taux de réponse des laboratoires adhérant ou participant au réseau VIGIMYC
UMR	Unité Mixte de Recherche
Var Lait	Variation de la quantité de Lait
VIGIMYC	VIGIlance vis-à-vis des MYCoplasmoses de ruminants
VNTR	Variable Number Tandem Repeat

Introduction

L'agalactie contagieuse, causée par plusieurs mycoplasmes pathogènes, représente un enjeu économique non négligeable dans les élevages caprins et ovins français. Elle est responsable le plus souvent de mammites, de (kérato)conjonctivites chez les adultes et d'arthrites chez les jeunes animaux. Toutes ces pathologies entraînent de la morbidité, voire de la mortalité, des pertes de lait, des pénalités engendrées par le taux de leucocytes dans le lait, un retard de croissance des jeunes lors d'arthrites, des réformes et la mise en place de traitements antibiotiques. En France, la majorité des élevages de petits ruminants est composée d'un grand nombre d'animaux et les mesures de prophylaxie sanitaire sont difficiles à mettre en œuvre. Il est donc très difficile d'éradiquer une pathologie, telle que l'agalactie contagieuse, dans ce type d'élevage, d'autant plus que des animaux restent porteurs de la bactérie. De plus, la mise en place de traitements antibiotiques reste illusoire pour cette pathologie et trop coûteuse pour l'appliquer à tous les animaux atteints. Il est donc très important de contrôler au maximum cette pathologie et d'éviter son expansion.

Le réseau d'épidémiologie des mycoplasmoses, VIGIMYC géré par l'Anses Lyon, œuvre pour surveiller les maladies, maîtriser le contexte épidémiologique et développer des techniques de diagnostic adaptées aux mycoplasmoses des ruminants. Ce réseau travaille en collaboration avec des laboratoires partenaires et la principale technique d'identification des mycoplasmes après culture est centralisée à l'Anses Lyon. Or, depuis plusieurs années, le nombre de souches reçues par VIGIMYC pour l'identification mycoplasmaïque a nettement diminué pour les prélèvements provenant de bovins et augmenté pour les prélèvements de caprins. Les raisons d'une telle diminution pour les bovins peuvent être une diminution de la demande d'analyses mycoplasmaïques par les vétérinaires ou la prise en charge complète des prélèvements provenant de bovins par les laboratoires vétérinaires français, par des techniques de PCR. Il était donc nécessaire de connaître les méthodes mises en œuvre par les laboratoires pour le diagnostic des mycoplasmoses et d'évaluer en particulier la place des techniques de PCR dans les laboratoires vétérinaires français. Un questionnaire a donc été rédigé et envoyé aux laboratoires vétérinaires français pour faire le bilan de ces informations.

Actuellement, la méthode de référence utilisée par VIGIMYC pour l'identification des mycoplasmoses des ruminants n'est pas décentralisable. Les délais de réponse sont donc longs et le nombre de prélèvements analysés simultanément est limité. Une rtPCR, spécifique à l'agalactie contagieuse, a été récemment mise au point pour la détection des espèces responsables de cette pathologie chez les petits ruminants : *Mycoplasma agalactiae* et le groupe « *mycoides* ». La détection et l'identification des mycoplasmes par une PCR multiplex et sa praticité ont donc été étudiées lors d'un suivi d'un élevage de caprins atteint d'agalactie contagieuse.

PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation des mycoplasmes

I.1. Taxonomie et morphologie des mycoplasmes

Les mycoplasmes sont des bactéries qui appartiennent à la classe des Mollicutes, à l'ordre I des Mycoplasmatales, à la famille des *Mycoplasmataceae* et au genre *Mycoplasma* [95]. Le groupe « *mycoides* » est un cluster phylogénétique qui regroupe les deux agents étiologiques de la PériPneumonie Contagieuse Bovine (PPCB) et de la PleuroPneumonie Contagieuse Caprine (PPCC) ainsi que trois des agents de l'agalactie contagieuse des petits ruminants : *Mycoplasma mycoides subsp. capri* (*Mmc*), *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum* (*Mcc*) et *Mycoplasma putrefaciens* (*Mp*) (Fig. 1). Le taxon *Mmc* regroupe désormais les deux taxons *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* Large Colony et *Mmc* suite à des révisions taxonomiques [66, 110].

Le terme Mollicutes vient du latin *mollis*, qui signifie « mou », et de *cutis*, qui signifie « peau ». Les mycoplasmes sont dépourvus de paroi de type bactérienne : on ne retrouve donc aucun des constituants pariétaux tels que le peptidoglycane et les acides diaminopinélique et muramique, classiquement présents chez les bactéries. Ils sont entourés par une simple membrane plasmique composée de trois feuilletts et sont donc très polymorphes.

Les mycoplasmes sont des bactéries de petite taille, mesurant de 0,2µm à 0,8µm. Ils représentent les plus petits Procaryotes capables de se multiplier de façon autonome en milieu acellulaire. Leur génome est également de très petite taille (de 600 à 1700Kb en moyenne), c'est le plus réduit du règne Procaryote. Il présente de plus un faible pourcentage en guanine et cytosine de l'ordre de 23 à 40%, ce qui permet de les différencier des autres procaryotes [94].

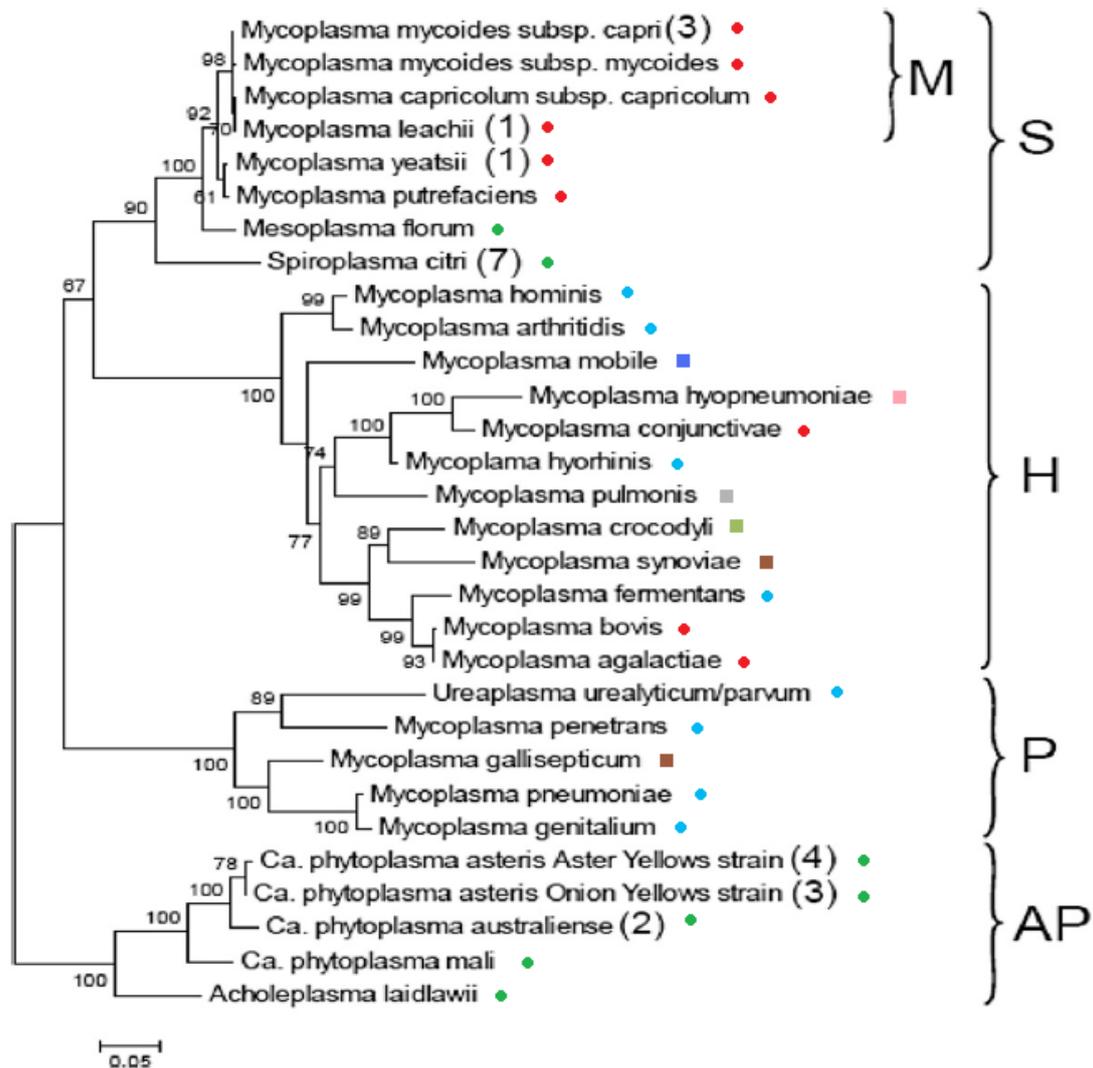


Figure 1. Arbre phylogénétique de classe des Mollicutes comprenant les espèces dont au moins une séquence de leur génome est disponible.

Il a été construit à partir de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) ribosomal 16S en utilisant la méthode du maximum de ressemblance à partir du modèle de Tamura-Nei. La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les différents groupes phylogénétiques des Mollicutes sont indiqués par les lettres à droite sur la figure : S, Spiroplasma ; H, Hominis ; P, Pneumoniae ; AP, Achleplasma-Phytoplasma ; M, groupe « mycoïdes » ; ●, hôte ruminant ; ●, hôte végétal ; ●, hôte humain ; ■, hôte volaille ; ■, hôte rat, hamster et souris ; ■, hôte crocodile ; ■, hôte poisson ; ■, hôte porc. D'après [29, 35, 74, 101].

Sur gélose, les mycoplasmes forment des colonies de petite taille, inférieures au millimètre, dont l'aspect est en « œuf sur le plat », le centre de la colonie étant surélevé (Fig. 2) [85, 99].

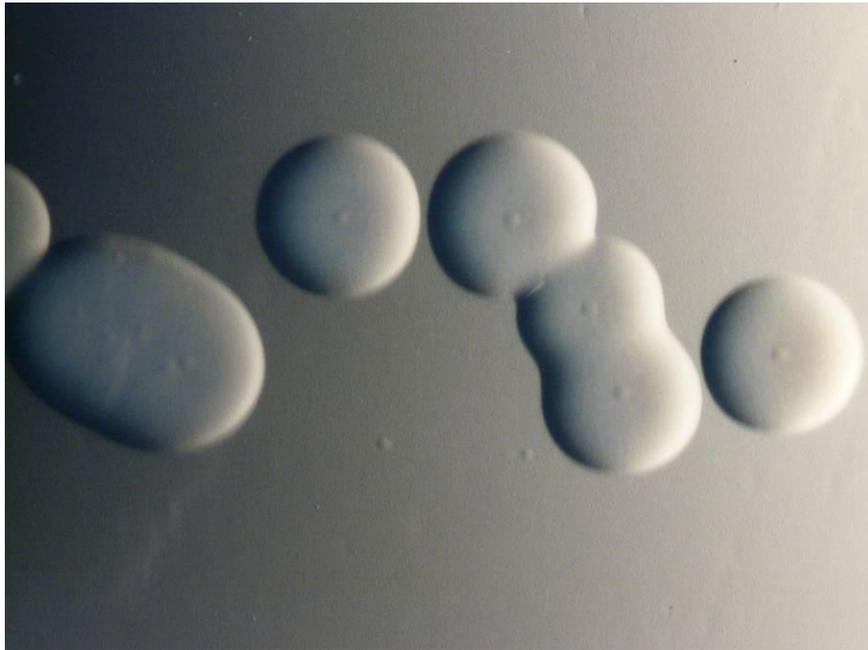


Figure 2. Colonies de *Mmc*.

Photographie réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire en éclairage inversé, après isolement sur boîte de pétri de culture à partir d'un prélèvement auriculaire de la chèvre 11147. Echelle : x20.

I.2. Caractères biologiques et physico-biochimiques

Les mycoplasmes ont des exigences nutritionnelles qui imposent l'utilisation de milieux complexes tel que le milieu *PleuroPneumoniae* Like Organism (PPLO) composé de :

- peptones,
- extrait de levure pour l'apport de vitamines B et des acides nucléiques,
- sérum pour l'apport de cholestérol,
- glucose et glycérol pour leur pouvoir tampon.

Les milieux de culture des mycoplasmes sont par ailleurs rendus sélectifs par ajout d'inhibiteurs tels que l'acétate de thallium, qui est un antifongique mais aussi un bactériostatique pour les bactéries aérobies sporulées et les Gram – et inhibiteur d'*Ureaplasma*, et la pénicilline ou l'amoxicilline (2 mg.mL^{-1}) qui sont des antibiotiques bactéricides. La croissance des mycoplasmes est obtenue dans ces milieux avec une incubation à 37°C à 5% de dioxyde de carbone (CO_2) pendant 2 à 10 jours en fonction des espèces [84].

Du fait de l'absence de paroi, les mycoplasmes sont très sensibles aux agents physico-chimiques tels que les ultraviolets, la chaleur, les pH acides (pH optimal de croissance à 7,5), les agents tensioactifs et les antiseptiques tels que les iodophores, le phénol et l'acide acétique. Ils sont détruits à 60°C en 10 minutes. Malgré leur grande fragilité dans le milieu extérieur, les mycoplasmes ont la capacité de survivre de quelques jours à plusieurs mois grâce à la production de biofilms sur les surfaces et en particulier si le milieu extérieur est riche en protéines, à basse température et

avec une humidité suffisante. Leur survie dépend des conditions environnementales, elle peut aller :

- de quelques heures à quelques jours à des températures supérieures à 30°C ;
- d'une à trois semaines à température ambiante ;
- d'un à plusieurs mois à des températures comprises entre 1 et 4°C ;
- de six mois à plusieurs années à des températures inférieures à 0°C, ceci permettant leur conservation [14].

Ils sont résistants à la classe des β -lactamines, ces dernières agissant sur la paroi des bactéries en bloquant la synthèse du peptidoglycane, l'élément majeur des parois des bactéries Gram +. Les β -lactamines sont donc utilisées en tant qu'inhibiteurs dans les milieux de culture des mycoplasmes, comme dit précédemment [34, 85, 99].

Les mycoplasmes sont ubiquitaires et peuvent être isolés aussi bien dans le monde animal que le monde végétal. Selon l'espèce de mycoplasme, ils peuvent être saprophytes, commensaux, opportunistes ou pathogènes des muqueuses respiratoires, urogénitales et oculaires chez les animaux. Ce sont des microorganismes extracellulaires anaérobies facultatifs [95].

II. Mycoplasmoses des ruminants

Les mycoplasmoses des ruminants représentent un enjeu économique important aussi bien français que mondial. En effet, certains mycoplasmes des ruminants sont responsables de pathologies très graves, dont certaines sont inscrites à l'Office International des Epizooties (OIE) [76]. Leur diagnostic est donc très important mais reste difficile. De plus, les mycoplasmes des ruminants peuvent être opportunistes (*M. arginini*, *M. alkalescens*, *M. yeatsii*, ...) ou pathogènes (*Ma*, *Mmc*, *Mcc*, ...). Pour d'autres, leur pouvoir pathogène reste encore à déterminer [90].

II.1. Principales mycoplasmoses bovines

II.1.a. Péripleurite contagieuse bovine (PPCB)

L'agent de la PPCB est *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (anciennement *biotype Small Colony*). La PPCB est inscrite sur la liste de l'OIE du fait de son caractère hautement contagieux et de la morbidité importante qu'elle entraîne chez l'hôte [77]. Elle sévit particulièrement en Afrique et sporadiquement en Asie. Les pertes économiques sont très importantes [62]. Elle est responsable de pneumonies et de pleurésies fibrineuses chez les adultes avec un pourcentage élevé de formes subcliniques. Une possible réémergence en France de cette maladie est surveillée par le réseau d'épidémiologie et de surveillance des maladies infectieuses (VIGIMYC) [33, 87, 89].

II.1.b. Affections à *Mycoplasma bovis* (Mb)

Mb est responsable de mammites à la fois subcliniques et cliniques chez les vaches laitières, de broncho-pneumonies infectieuses enzootiques chez les veaux, d'arthrites, d'otites moyennes et internes, d'avortements ou encore de kérato-conjonctivites infectieuses [62, 108]. En France, *Mb* est principalement responsable de pathologies respiratoires et son diagnostic se réalise par des méthodes antigéniques telles que le Pulmotest de Bio-X [26] ou par des PCR ciblées réalisées par le réseau d'épidémiosurveillance des mycoplasmoses VIGIMYC ou par les laboratoires vétérinaires français [62].

II.2. Principales mycoplasmoses décrites chez les petits ruminants

Les principales mycoplasmoses décrites chez les petits ruminants sont listées dans le tableau I ci-dessous. L'agalactie contagieuse des petits ruminants sera par la suite plus particulièrement développée, puisqu'elle constitue le sujet de cette étude.

Tableau I. Principales mycoplasmoses des petits ruminants, agents étiologiques, principaux symptômes, répartition géographique et prélèvements à effectuer pour leur diagnostic [9,16, 17, 42, 73, 76, 77, 81, 93, 100].

Mycoplasmoses	Agents étiologiques	Signes cliniques	Présence géographique	Prélèvements
Agalactie contagieuse sensu stricto	<i>M. agalactiae</i> uniquement	Mammite, arthrite, septicémie, kératoconjonctivite	Pourtour méditerranéen, Afrique, Brésil, Canaries	Lait, liquide synovial, écouvillon oculaire
Syndrome de l'agalactie contagieuse	<i>M. agalactiae</i> <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> <i>M. putrefaciens</i>	Pneumonie, arthrite, mammite, kératoconjonctivite, septicémie, abcédation, septicémie chez les jeunes	Monde	Poumons, liquide synovial, lait, écouvillons oculaire et auriculaire
Pneumonie atypique non progressive	<i>M. ovipneumoniae</i>	"Syndrome de la toux"	Monde	Poumons, trachée, sécrétions nasales
Maladie respiratoire	<i>M. arginini</i> (opportuniste uniquement)	Pneumonie, kératoconjonctivite	Monde	Poumons
Pleuropneumonie contagieuse caprine (MRC)	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	Abattement, anorexie, toux, animal souvent couché, retard de croissance, hyperthermie	Afrique, Asie	Poumons
Pleuropneumonie et arthrite	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Hyperthermie, anorexie, douleur, arthrite, boiterie, dyspnée, septicémie, avortement	Monde	Liquide synovial, poumons

II.3. Agalactie contagieuse des petits ruminants

II.3.a. Agents étiologiques

L'origine de l'agalactie contagieuse est multiple : *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*), qui est l'agent « classique » et le seul agent que l'on retrouve chez les ovins [15], et de trois espèces du groupe « *mycoides* » : *Mmc* (regroupant dorénavant *M. mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony et *Mmc* [66]), *Mcc* et *Mp*, ce dernier représentant un agent étiologique secondaire de l'agalactie contagieuse [19].

II.3.b. Clinique

Les signes cliniques et leur évolution varient en fonction du mycoplasme en cause et de l'hôte.

Ma est responsable de trois formes cliniques : typique, « atypique » et asymptomatique. Les formes typiques peuvent se manifester dans un premier temps par un bref syndrome fébrile dû à la phase de bactériémie [19]. Trois types de signes cliniques majeurs sont ensuite possibles en fonction de l'organe cible. Le principal est la mamelle, on remarque une hypogalactie ou une agalactie brutale, accompagnée de mammites. Les articulations représentent aussi un organe cible, les (poly)arthrites touchant surtout les carpes et les tarses des caprins et des jeunes ovins [25]. Enfin, les (kérato)conjonctivites peuvent être observées sur toutes les catégories d'animaux. D'autres signes cliniques peuvent être observés plus rarement tels que des avortements en fin de gestation et une atteinte pulmonaire. La récupération peut être totale (ovins) ou partielle. Les formes « atypiques » regroupent des vulvo-vaginites granuleuses et des pleuropneumonies chez les caprins, peu observées en France. Des formes asymptomatiques sont possibles chez les ovins, l'isolement de *Ma* dans le lait ne modifie alors pas la production laitière [19, 38].

Mmc est responsable de très sévères mammites avec agalactie chez les caprins uniquement, pouvant évoluer rapidement en bactériémie mortelle avec préalablement un bref syndrome fébrile dans certains cas [106]. Les (kérato)conjonctivites sont plus rares ainsi que les avortements, les péritonites ou les abcès localisés. Chez les chevreux, des (poly)arthrites et des pneumopathies sont fréquemment observées. D'importants taux de mortalité néonatale peuvent être observés et une atteinte du système nerveux central est possible. Des formes « atypiques » ont été décrites en Afrique et en Australie, se caractérisant par des balanoposthites et des vulvo-vaginites ulcéreuses ovines.

Mcc provoque chez les caprins adultes principalement des (poly)arthrites avant les mammites et l'agalactie et les (kérato)conjonctivites, ces dernières étant encore moins fréquentes. Occasionnellement, il peut y avoir une atteinte respiratoire et rarement des avortements. Chez les jeunes, l'atteinte est souvent très grave et est du même type que *Mmc*. Des formes « atypiques » ont été remarquées en Angleterre, se caractérisant par une vulvo-vaginite et une balanoposthite ovine.

Mp est moins fréquent que les trois précédents. On le considère comme un agent pathogène opportuniste pouvant provoquer, chez les caprins uniquement, des syndromes de mammites-arthrites avec parfois une évolution bactériémique [17, 18, 28, 30, 31, 68, 69, 80, 105].

La prévalence des mammites dues au groupe « *mycoïdes* » dépend de deux caractéristiques majeures : le stade physiologique des femelles et les mouvements d'animaux. En effet, la prévalence clinique maximale se trouve au moment de la mise bas, de la mise à la traite et à la période estivale de transhumance.

Les lésions observées suite à l'agalactie contagieuse sont donc :

- des lésions mammaires : mammites, adénomégalie des ganglions proches ;

- des lésions oculaires : (kérato)conjonctivites ;
- des lésions articulaires : (poly)arthrites plus ou moins chroniques sur les carpes ou les tarse ;
- des lésions de bronchopneumonies et de vulvo-vaginites, plus rarement (Fig. 3) [22].

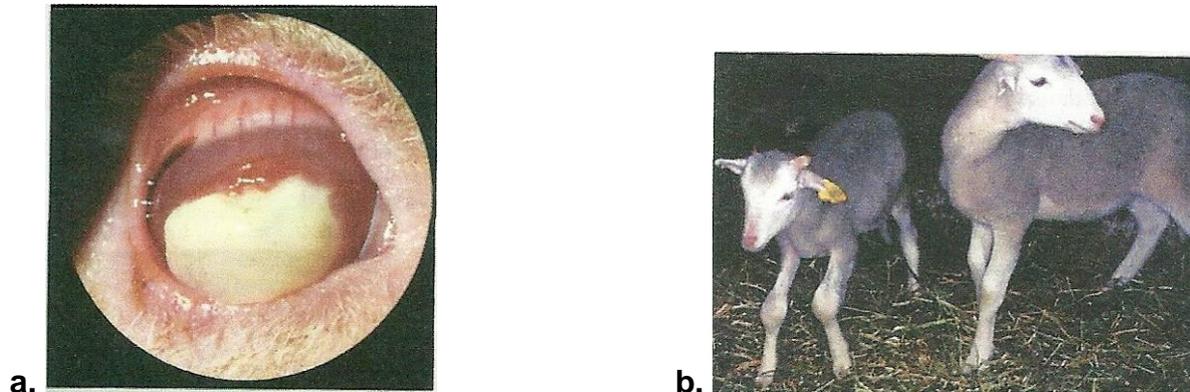


Figure 3. a. Kératoconjonctivite à *Ma* chez une brebis. b. Polyarthrite et ankylose chez un agneau (à gauche) [21].

L'agalactie contagieuse représente un enjeu économique très important de par les pertes engendrées. En effet, l'agalactie contagieuse est responsable de mortalité, surtout chez les caprins. Les traitements antibiotiques, l'achat de colostrum pour les jeunes et les réformes génèrent des coûts supplémentaires. De plus, l'agalactie contagieuse engendre des pertes de lait non négligeables et une augmentation des comptages des cellules somatiques, [37] ce qui entraîne une baisse du rendement et des pénalités. Les échanges commerciaux sont défavorisés. La maladie ne semble, en revanche, avoir aucun effet sur le taux butyreux, le taux protéique et le taux en lactose [46].

II.3.c. Epidémiologie

- *Descriptive*

Les agents étiologiques de l'agalactie contagieuse sont retrouvés chez les petits ruminants (caprins et ovins) aussi bien domestiques que sauvages, tels que les bouquetins des Alpes [107] ou les camélidés andins [15]. Les animaux sauvages représentent donc un réservoir potentiel des agents de l'agalactie contagieuse.

L'agalactie contagieuse a une répartition mondiale très large. Le bassin méditerranéen est particulièrement touché ainsi que l'Europe orientale. Au niveau mondial, *Ma* représente la dominante étiologique chez les ovins alors que les caprins sont principalement infectés par *Mmc* et *Mcc*. En France, d'après les données du réseau d'épidémiosurveillance VIGIMYC, chez les chèvres l'agent le plus fréquent était *Mmc* (42%), puis *Mcc* (26%), ensuite *Mp* (15%) et *Ma* ne représentait que 3%, en 2010 [33]. Les Pyrénées-Atlantiques constituent le dernier bassin d'enzootie ovine à *Ma* [23].

- *Analytique*

Les mycoplasmes forment des biofilms dans le milieu extérieur, ce qui leur confère une grande capacité à survivre dans ce dernier et donc à contaminer le matériel de traite et donc les animaux [18].

Les sources d'infection varient en fonction de la forme de la maladie et de l'état de santé de l'animal. Les animaux présentant des signes cliniques (dits « symptomatiques »), les animaux ayant présenté des signes cliniques et n'en ayant plus (dits « guéris »), les animaux ne présentant aucun signe clinique mais porteurs d'agents étiologiques (dits « porteurs sains ») et le milieu extérieur sont les sources de contamination. Lorsque l'infection est symptomatique et que les animaux sont encore malades, l'excrétion précède le plus souvent l'expression clinique de plusieurs jours et est maximale lors de la phase clinique de l'agalactie contagieuse. Les matières contaminantes sont alors le lait, les larmes, les sécrétions ou le jetage respiratoires, les fèces, les urines, le produit pathologique articulaire, les sécrétions utéro-vaginales et les sécrétions génitales mâles [47]. Lorsque les animaux sont cliniquement guéris, l'excrétion par le lait et par les sécrétions respiratoires perdure, ces animaux asymptomatiques excréteurs sont à l'origine du maintien et de l'extension de l'infection au sein du troupeau. Lorsque les animaux sont asymptomatiques, le portage est possible dans les conduits auditifs externes [70], la cavité buccale, les cavités nasales, la vulve, les amygdales, les testicules et les glandes bulbourétrales [54]. Chez la chèvre, les quatre espèces de mycoplasmes ont été isolées à partir d'écouvillonnages auriculaires dans l'ordre de fréquence décroissant : *Mmc*, *Mcc*, *Mp*, *Ma* [23]. Ce portage auriculaire est moins fréquent chez la brebis. Mais les modalités de réactivation en un agent pathogène ne sont pas connues [106].

Deux modalités sont possibles pour la transmission des mycoplasmes : verticale et horizontale. La transmission verticale *in utero* est fortement suspectée dans le cas des (poly)arthrites chez les nouveau-nés. La transmission horizontale directe se fait par les voies respiratoire, mammaire ou sexuelle. La transmission horizontale indirecte se fait par l'intermédiaire de vecteurs parasitaires (acariens des conduits auditifs externes, tiques et puces) [41], du milieu extérieur, lors de la traite [42, 59, 115] ou lors de la tonte.

Différentes voies de pénétration des mycoplasmes sont possibles (Fig. 4). La voie orale représente une voie majeure de pénétration des mycoplasmes, par ingestion de lait contaminé chez les jeunes et chez l'adulte à partir des abreuvoirs et mangeoires communs. Le lieu d'adhésion privilégié et d'invasion éventuelle semble être l'intestin grêle. La voie respiratoire reste controversée. La contamination des adultes est favorisée par un contact étroit. La voie mammaire représente la principale voie de contamination des femelles en lactation. Lors de la traite manuelle ou automatique, il y a un dépôt de mycoplasmes sur les trayons et/ou transport actif par phénomène d'impact lors de traite mécanique. Les mycoplasmes peuvent pénétrer par voie oculaire suite à des contacts étroits, à l'émission d'aérosols infectieux ou à l'instillation accidentelle de particules contaminées. D'autres voies mineures sont

possibles telles que celle sous-cutanée ou intradermique lors de la tonte ou en cas d'écorchures.

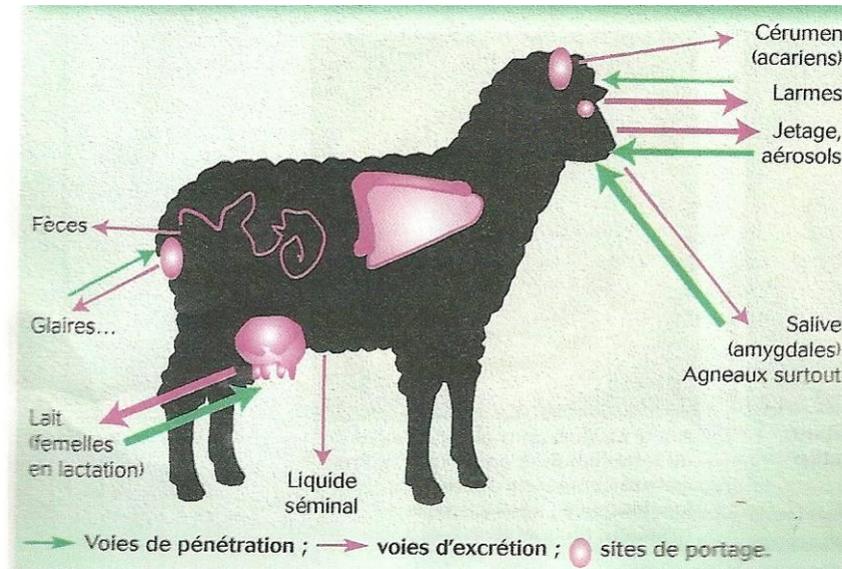


Figure 4. Voies de pénétration, sites de portage et voies d'excrétion de Ma. D'après [21].

Des facteurs favorisant existent pour l'infestation de mycoplasmes, tels que l'espèce hôte, l'âge, le sexe, le stade physiologique et le statut immunitaire. En ce qui concerne l'espèce hôte, les mycoplasmoses sont en général plus sévères chez les caprins que les ovins. Les jeunes sont plus sensibles que les adultes. Les mâles adultes et les femelles tarées et vides expriment moins nettement la maladie que les femelles gravides ou en lactation. Une primo-infection permet d'atténuer la gravité clinique des mycoplasmoses [21].

- *Synthétique*

La filière caprine se caractérise par un commerce plus important de reproducteurs et de sélection génétique que la filière ovine, ce qui peut favoriser la diffusion de l'infection. Comme dit précédemment, les caprins sont plus sensibles aux mycoplasmoses et le portage auriculaire représente une voie de transmission non négligeable aussi bien par contact que par l'intermédiaire de vecteurs parasites, tels que des acariens hématophages [39, 40, 58]. De plus, les porteurs chroniques ou sains favorisent la persistance et l'extension de l'infection au sein de l'élevage. La gravité clinique dépend du statut immunitaire des animaux, du taux et du mode de renouvellement de l'effectif et de divers facteurs environnementaux. Enfin, l'introduction d'animaux porteurs ou le contact entre troupeaux est à l'origine de l'infection d'élevages indemnes.

II.3.d. Diagnostic

- *Diagnostic différentiel*

D'autres agents pathologiques, autres que ceux responsables de l'agalactie contagieuse, sont responsables d'un syndrome mammites-arthrites d'allure contagieuses ou enzootiques. On peut citer, par ordre décroissant de similitude des manifestations cliniques, le CAEV (ArthroEncéphalite Virale Caprine) [50], les streptocoques, les arcanobactéries, les staphylocoques, les virus Visna Maedi, Mannheimia, *Erysipelothrix rhusopathiae* (responsable du rouget) et les chlamydias [67].

- *Prélèvements*

Les prélèvements diffèrent selon si l'agalactie contagieuse est suspectée ou pas et selon le statut de la région. En cas de suspicion clinique, le lait des femelles présentant des mammites ou une diminution de la production laitière représente le prélèvement de choix. Il doit être prélevé de façon stérile [63]. En cas de kérato-conjonctivite, il est fortement conseillé d'effectuer un écouvillonnage oculaire (culs de sac conjonctivaux). En cas d'arthrite, il faudra prélever le liquide synovial des articulations atteintes. En l'absence de signes cliniques, il est conseillé de réaliser des suivis épidémiologiques autour des foyers et d'identifier les troupeaux excréteurs chroniques asymptomatiques. Et en région indemne, il est utile de détecter des infections subcliniques ou asymptomatiques pour détecter des atteintes chroniques et identifier des souches avirulentes [24, 97, 112, 113, 114].

A l'échelle individuelle, on préférera le prélèvement de lait étant donné que l'excrétion galactophore est précoce, intense et durable, bien qu'elle puisse devenir intermittente lors du passage à la chronicité [7]. Chez les caprins, l'écouvillonnage des conduits auditifs externes est une technique facile et rapide, elle permet souvent d'isoler les quatre agents de l'agalactie contagieuse mais le lien avec un épisode clinique n'est pas systématique (cf. Partie expérimentale chapitre II de ce travail) [52, 103]. A l'échelle du troupeau, il est conseillé de prélever du lait de mélange en début de lactation, lorsque l'excrétion est maximale. Ces prélèvements doivent être acheminés sous couvert du froid dans les 24-48h au laboratoire.

- *Diagnostic direct*

La mise en évidence directe des mycoplasmes passe essentiellement par la culture de ces derniers, qui est lente et difficile et doit se faire sur des milieux spécifiques comme vu précédemment. Les colonies d'aspect « œuf sur le plat » apparaissent au bout de un ou deux jours pour *Mmc* ou *Mcc* et au bout de deux à cinq jours pour *Ma*. Pour l'isolement en milieu liquide, il est conseillé de pratiquer plusieurs dilutions décimales du prélèvement afin de limiter les contaminants.

Plusieurs méthodes existent pour l'identification des mycoplasmes isolés en culture :

- Les critères biochimiques : seuls quelques laboratoires continuent d'utiliser cette méthode qui consiste en une batterie de tests biochimiques suivis de tests sérologiques, tels que l'inhibition de croissance, l'inhibition du métabolisme, l'immunofluorescence ou les tests à l'immunoperoxydase sur colonies [91, 92]. L'identification des mycoplasmes sur critères biochimiques tend peu à peu à être abandonnée du fait de l'interprétation délicate et du nombre de manipulations à effectuer ;

- La méthode immunoenzymatique, Membrane Filtration Dot immunobinding (MF-dot) : méthode de référence du réseau VIGIMYC, dont le principe est expliqué dans la partie III.2.b [84, 88] ;

- La PCR [98] et la PCR en temps réel (rtPCR) : plusieurs méthodes existent avec des gènes ciblés différents et des amorces spécifiques de *Ma* d'une part et du groupe « *mycoides* » (*Mcc*, *Mmc* et *Mp*) d'autre part [11, 12, 61].

- *Diagnostic indirect : sérologie*

Deux techniques de diagnostic sérologique peuvent être utilisées : la fixation du complément, aujourd'hui abandonnée, et les techniques ELISA, utilisée pour le diagnostic de *Ma*. Il n'existe pas de kit ELISA pour le groupe « *mycoides* ». La technique de fixation du complément est constituée de deux étapes. La première phase correspond à la réaction de l'antigène avec les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon à analyser. La deuxième phase correspond à l'addition d'un système révélateur (nommé système hémolytique), composé par des immunocomplexes d'hématies et d'anticorps homologues. Cette technique est moins spécifique et moins sensible que les techniques ELISA. Les deux principaux kits ELISA utilisés sont basés sur la détection des anticorps dirigés contre une protéine de fixation (la lipoprotéine P48) pour l'un et des anticorps anti-antigènes totaux pour l'autre [86]. D'autres techniques ont été mises au point pour la détection de *Ma*, comme la technique de Western Blot, mais la technique ELISA reste la plus efficace [60].

II.3.e. Traitements

Pour être efficaces contre les mycoplasmes responsables de l'agalactie contagieuse, les antibiotiques doivent posséder différentes propriétés : une activité sur les bactéries dépourvues de paroi, une bonne persistance plasmatique, une bonne diffusion tissulaire, une bonne diffusion dans l'organe atteint (la mamelle, l'articulation, les culs de sac conjonctivaux) et des concentrations minimales inhibitrices faibles [24]. Les principales molécules utilisables sont donc les tétracyclines, les macrolides, le florfenicol, la tiamuline et les fluoroquinolones [1, 75]. Or il existe très peu de molécules antibiotiques avec une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les petits ruminants et l'utilisation de certaines sont interdites

chez la femelle en lactation. Les délais d'attente à appliquer dans le cas d'une utilisation hors AMM sont donc les délais forfaitaires très longs (7 jours pour le lait et 28 jours pour la viande) et relèvent de la responsabilité du prescripteur [83]. Les vétérinaires et les éleveurs se retrouvent donc souvent dépourvus face à l'agalactie contagieuse.

Pour un traitement antibiotique au tarissement, seul le Nafpenzal[®] T (benzylpénicilline-nafcilline-dihydrostreptomycine) et le Céfovet[®] HL (céfazoline) possède l'AMM pour les petits ruminants [3]. De nombreux éleveurs utilisent des spécialités ne possédant d'AMM que chez la vache laitière, tels que le Cloxagel[®] (cloxacilline-néomycine) et le Spéciorlac[®] (spiramycine-néomycine). Ces deux spécialités ont fait l'objet d'essais dans les élevages français et les résultats curatifs étaient intéressants [20].

Pour les brebis et les chèvres en lactation, les vétérinaires ont plus de médicaments à leur disposition comme le Tylan[®] 200 (tylosine), le Spectam[®] Solution Injectable (spectinomycine) et en particulier ceux à base d'oxytétracycline (Acti Tetra I[®], Duphacycline[®], Oxytetrin P[®], ...). Pour les agneaux et les chevreaux, les vétérinaires peuvent utiliser les médicaments à base d'oxytétracycline (Acti Tetra I[®], Duphacycline[®], Oxytetrin P[®], ...), de colistine et d'érythromycine (Colidiaryl[®]), de lincomycine et de spectinomycine (Linco-Spectin[®] Injectable) et d'érythromycine (Erythrocin[®]). D'après l'enquête sur l'utilisation des antibiotiques chez les ruminants domestiques en France, les antibiotiques les plus utilisés par les éleveurs sont les pénicillines (60% pour les ovins et 50% pour les caprins), les aminosides (50% pour les ovins et 40% pour les caprins) et les tétracyclines (30% pour les ovins et 20% pour les caprins). Les céphalosporines et les fluoroquinolones ne sont que rarement employés par les éleveurs d'ovins (moins de 1,5 %) et de caprins (7 % pour les céphalosporines, 6 % pour les fluoroquinolones) [51, 57].

Cependant, les traitements antibiotiques contre l'agalactie contagieuse présentent une limite majeure : bien que la guérison clinique semble possible, la guérison bactériologique des animaux, elle, reste très difficile [17]. On remarque ainsi une amélioration clinique des animaux malades et une diminution de la mortalité surtout chez les caprins, ce qui permet d'envisager une réforme ultérieure. Mais, les animaux restent le plus souvent porteurs chroniques de ces mycoplasmes. Les causes possibles sont l'antibiorésistance acquise, une mauvaise diffusion de l'antibiotique dans la mamelle ou l'articulation atteinte, une activité uniquement bactériostatique telles que les tétracyclines ou des erreurs thérapeutiques (sous dosages, traitements trop courts ou mis en œuvre trop tardivement). En effet, plusieurs études ont été menées en Espagne sur la sensibilité des mycoplasmes des petits ruminants aux antibiotiques. *Ma* reste sensible aux lincosamides (clindamycine), aux fluoroquinolones, aux tétracyclines et à la majorité des macrolides (tylosine et tilmicosine) mais est résistant à la streptomycine, à l'érythromycine (groupe des macrolides) et à l'acide nalidixique [6, 44]. Les molécules les plus efficaces sur *Mmc* sont aussi les fluoroquinolones, les tétracyclines et la majorité des macrolides mais *Mmc* est résistant à la streptomycine, la spectinomycine (groupes des macrolides), la gentamicine (groupe des aminosides)

et l'acide nalidixique [5]. *Mp* est sensible aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, à la lincomycine (groupe des lincosamides) et aux macrolides, mais une diminution de l'efficacité de ces trois derniers a été observée [4]. A noter aussi que les fluoroquinolones font parties des antibiotiques dits critiques dont l'utilisation doit être gardée pour les cas graves. De plus, la mise en œuvre du traitement de l'agalactie contagieuse représente une lourde charge de travail pour l'éleveur du fait de la taille des élevages et les défauts d'hygiène lors des injections intramammaires peuvent être à l'origine de graves mammites cliniques [24].

D'autres alternatives de traitements telles que l'homéopathie ou la phytothérapie peuvent être envisagées. En effet, une étude a été menée pour étudier la sensibilité de *Mmc* à certains extraits de plantes. Il serait sensible aux extraits de baie de sureau, à l'huile d'origan, aux extraits aqueux de thym, aux extraits éthanoliques de feuilles d'origan, de racines d'Hydraste du Canada et de l'astragale. Et il serait résistant aux extraits aqueux de l'astragale, à l'huile de calendula et à l'argent colloïdal [8].

II.3.f. Prophylaxie

- *Médicale*

L'antibioprévention est strictement interdite en France. Plusieurs études ont donc été menées pour mettre au point un vaccin anti-mycoplasme mais, à ce jour, la vaccination reste inefficace contre l'infection et non autorisée en France depuis plusieurs années. Différents types de vaccins sont possibles : les vaccins inactivés (stock-vaccins), les auto-vaccins (inactivés) et les vaccins vivants atténués. Les vaccins inactivés sont des vaccins de première génération, ils sont fabriqués à partir des souches locales et de multiples rappels sont nécessaires [45]. Ils ne possèdent pas d'AMM ni d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en France. Ils sont en revanche très utilisés dans les pays méditerranéens. Ils ne permettent pas de prévenir l'infection mais on remarque une atténuation passagère de l'expression clinique. Ils peuvent être responsables de la sélection de porteurs asymptomatiques contagieux et rendent impossible le sérodiagnostic ELISA [38]. Les auto-vaccins eux étaient commercialisés en France mais ont été interdits en 2007. Ils ont sans doute participé à la transmission historique de la Tremblante en Italie par exemple [14]. Il existe différentes stratégies antigéniques : antigène total (France) et exopolysaccharide (Espagne). Enfin, les vaccins vivants atténués sont à proscrire : la protection contre l'expression clinique est plus marquée que pour les autres vaccins mais une infection transitoire avec excrétion reste possible, de multiples rappels sont nécessaires, l'innocuité de ces vaccins n'est pas totale ce qui impose certaines conditions d'utilisation très strictes et cette vaccination est sans doute incompatible avec la sérologie et l'antibiothérapie.

- *Sanitaire*

La prophylaxie sanitaire constitue l'élément clé de l'assainissement voire de l'éradication de l'agalactie contagieuse dans les troupeaux français. Elle repose sur deux fondements : la détection des animaux porteurs asymptomatiques ou malades et la qualification des troupeaux à l'aide des outils microbiologiques et sérologiques d'une part, et la réduction de la prévalence par l'élimination, l'isolement et la protection d'autre part [36]. Différentes mesures sont possibles et diffèrent selon le statut du troupeau (infecté ou non) et le statut de la région (infectée ou non) [32, 63].

Le contrôle de l'agalactie contagieuse dans un troupeau infecté est très difficile et impose des actions sanitaires très rigoureuses. Tout d'abord, lors d'apparition d'un foyer, il faudrait, dans la mesure du possible, abattre le troupeau en totalité. En effet, de par la présence de porteurs asymptomatiques et d'excréteurs chroniques, il est illusoire de penser à effectuer un assainissement par élimination des animaux symptomatiques uniquement. De plus, lors du renouvellement du troupeau, les agents de l'agalactie contagieuse continueront à circuler dans l'élevage en particulier chez les jeunes animaux et les primipares en début de lactation. Les mouvements seront limités à cause du risque de contamination des troupeaux voisins. Un dépistage individuel exhaustif de tous les animaux représente une charge économique pour l'éleveur beaucoup trop importante par rapport à la faible valeur économique de ses animaux. L'abattage total est souvent mieux accepté dans les régions indemnes que dans les régions d'enzootie [15]. En effet, à la fin des années 1990 et des années 2000, l'abattage total avait été ordonné lors d'épisodes d'agalactie contagieuse en Savoie et ceci avait été très traumatisant pour les éleveurs. La valeur génétique de certains animaux s'oppose aussi parfois à l'abattage total du troupeau. Dans ce cas, on peut appliquer des mesures d'abattage partiel, qui sont le plus souvent mises en œuvre à la fin de la lactation, par la réforme des animaux n'ayant pas récupéré leur potentiel de production laitière. Il est conseillé d'effectuer des examens cliniques répétés et rigoureux des mamelles pour limiter le nombre d'excréteurs chroniques en réformant. Puis, les sources environnementales (matériel de traite et bâtiment d'élevage en général) doivent être aussi contrôlées et réduites. La désinfection suivie d'un vide sanitaire est indispensable après un abattage total. En cas d'abattage partiel, elle doit s'appliquer dès que cela est possible dans les bâtiments tels que la maternité et le box de quarantaine. Ensuite, il faut limiter la transmission entre les adultes et entre les adultes et les jeunes. Entre adultes, la contamination s'effectue par la traite. Il faut faire vérifier la machine à traire une fois par an, limiter les pratiques favorisant les fluctuations du niveau de vide et le phénomène d'impact et renforcer l'hygiène lors de la traite. Le post-trempage est vivement conseillé. Un ordre de traite peut être mis en place, les premières à être traitées étant les femelles supposées saines. Les animaux malades doivent être, dans la mesure du possible, mis en quarantaine avant d'être réformés pour ne plus avoir de contact avec le reste du troupeau. Pour éviter la contamination entre les adultes et les jeunes, il est conseillé de séparer les jeunes de leur mère dès

la naissance et de les nourrir avec du colostrum thermisé (60°C pendant 60 minutes) [78] ou du colostrum bovin [15, 32].

Dans les régions d'enzootie, l'objectif est de circonscrire progressivement l'infection à certaines zones puis de viser l'assainissement. Ceci est permis grâce à la mise en place de plans de lutte nationaux (Fig. 5). Ces plans de lutte s'appuient sur deux conditions : la déclaration obligatoire des cas et la qualification annuelle de tous les troupeaux. L'extension de l'infection est limitée par le contrôle des mouvements individuels d'animaux (statut des troupeaux d'origine, dépistage de chaque animal, mise en quarantaine lors d'introduction de nouveaux animaux ou interdiction d'entrée ou de sortie d'animaux dans les zones à risque) et par le contrôle des mouvements des troupeaux (transhumance dans des pâturages collectifs après tarissement, transhumance dans des pâturages isolés, mise en place de double clôtures ou interdiction totale de transhumance) [15].

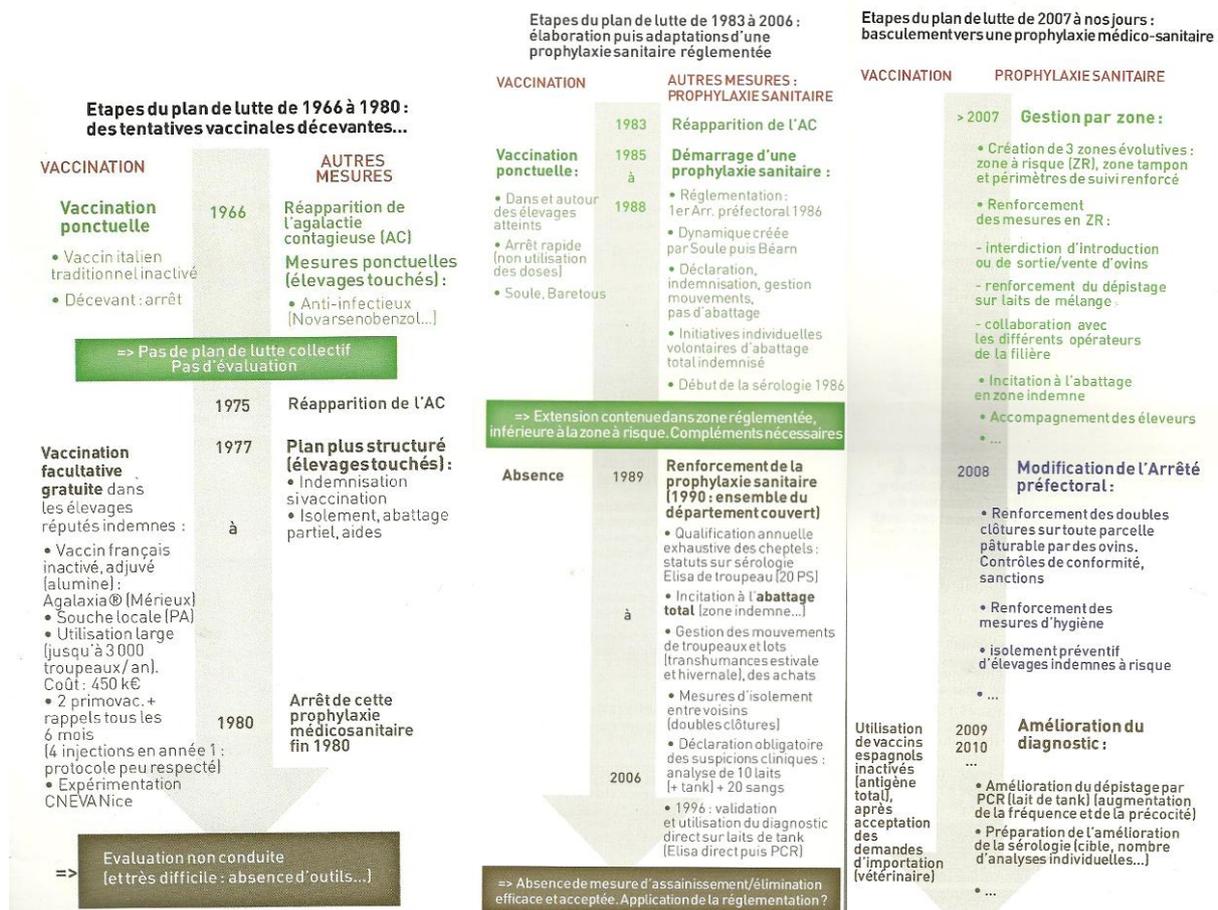


Figure 5. Plans de lutte nationaux mis en place contre l'agalactie contagieuse de 1966 à aujourd'hui.

L'évolution des plans de lutte se divise en trois temps, un premier temps de 1966 à 1980, où très peu d'outils diagnostic étaient disponibles et la vaccination était pratiquée ; une deuxième période de 1983 à 2006, pendant laquelle une véritable prophylaxie sanitaire a été mise en place et renforcée et enfin un dernier temps de 2007 à aujourd'hui, où la prophylaxie sanitaire a été modifiée et renforcée et où le point déterminant pour le dépistage a été l'élargissement de l'utilisation du diagnostic direct par PCR. D'après [23].

Dans les régions indemnes, toutes ces mesures peuvent être mises en place. Mais il est surtout très important de mener une prophylaxie sanitaire défensive en contrôlant les animaux introduits et en appliquant la mise en quarantaine à l'introduction. Il est aussi possible d'effectuer des sondages sérologiques [15].

III. Epidémiologie des mycoplasmoses de ruminants en France par le réseau VIGIMYC

VIGIMYC (pour VIGilance vis-à-vis des MYCoplasmoses de ruminants) est un réseau d'épidémiologie des mycoplasmoses des ruminants en France, en fonction depuis 1995 mais officialisé en 2003 par la signature d'une charte entre les différents partenaires et l'Anses Lyon [33].

III.1. Intérêt de la surveillance

Les objectifs de VIGIMYC sont de :

- Identifier les différentes espèces de mycoplasmes isolés chez les ruminants ;
- Suivre l'évolution des mycoplasmoses des ruminants sur l'ensemble du territoire national et détecter l'émergence de nouvelles espèces ou variants ;
- Détecter une éventuelle réémergence en France de la Pleuropneumonie Contagieuse des Bovins due à *M. mycoides subsp. mycoides* (anciennement appelé *M. mycoides Small Colony*) ;
- Partager des informations scientifiques et des connaissances techniques relatives aux mycoplasmes des ruminants ;
- Constituer une collection représentative des souches de mycoplasmes isolées chez les ruminants sur l'ensemble du territoire français.

III.2. Organisation du réseau

Plusieurs organismes et personnes interviennent dans le réseau VIGIMYC (Fig. 6). A la demande du vétérinaire, le laboratoire partenaire recherche par culture un ou plusieurs mycoplasmes chez un animal. Les isolats sont ensuite envoyés à l'Anses Lyon, accompagnés d'une fiche de commémoratifs. L'Anses Lyon est chargé de l'identification des souches de mycoplasmes, de la saisie des données dans la base de données du réseau VIGIMYC, de la transmission de l'identité des souches au laboratoire demandeur et du stockage des souches présentant un intérêt. Le réseau est doté d'un comité national de pilotage dont le rôle est de superviser le bon fonctionnement et la coordination du réseau, d'avaliser les procédures et techniques utilisées et de désigner des comités techniques spécialisés [33].

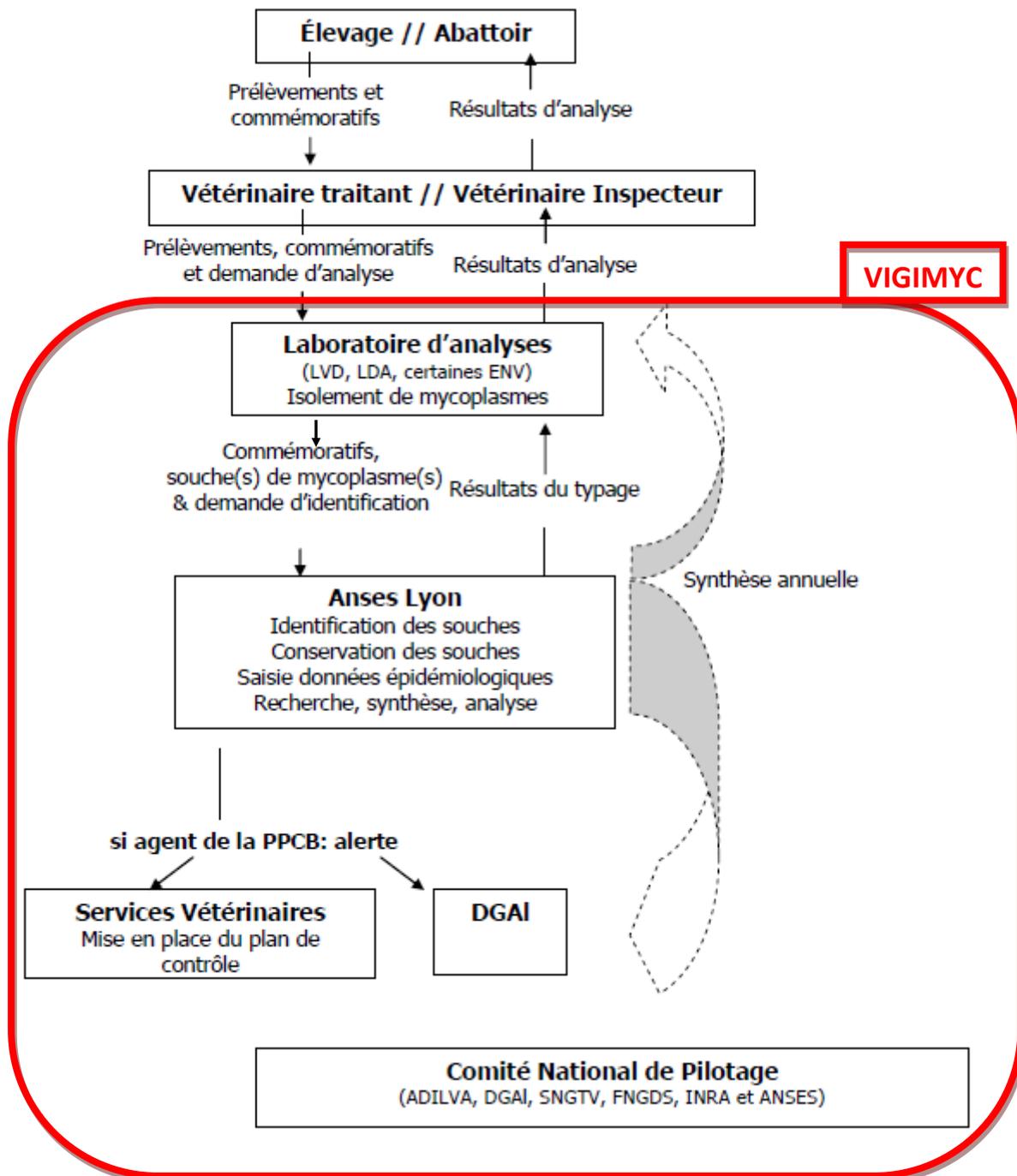


Figure 6. Echanges entre partenaires du réseau VIGIMYC [49].

III.2.a. Standardisation

Afin de faciliter l'exploitation de toutes les données envoyées à VIGIMYC avec les prélèvements, le réseau a mis en place :

- des fiches techniques pour standardiser les méthodes de prélèvements (Annexe 1), d'isolement des mycoplasmes des ruminants (Annexe 2) et de transmission des souches à VIGIMYC (Annexe 3) ;
- une fiche par animal de collecte des commémoratifs associés à la souche transmise à l'Anses Lyon pour identification (Annexe 4).

De plus, le réseau VIGIMYC a déjà organisé trois Essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) à l'isolement des mycoplasmes des ruminants, qui avaient pour objectif de permettre aux laboratoires de s'autoévaluer sur leur technique d'isolement des principales espèces de mycoplasmes pathogènes de ruminants. Le dernier a été effectué en 2011 et vingt-neuf laboratoires y ont participé. Les deux déviations majeures ressortant de ces EILA ont été des inter-contaminations entre prélèvements et la confusion entre contamination par des bactéries classiques et culture de mycoplasmes à croissance exubérante (*Mmc*). Ces erreurs sont facilement corrigeables [87].

III.2.b. Méthode d'identification en routine : le Membrane Filtration Dot immunobinding (MF-dot)

Après avoir mis en culture les prélèvements envoyés par les vétérinaires et détecté la présence de mycoplasmes, les laboratoires partenaires isolent chaque souche de mycoplasme et envoient chaque isolat à l'Anses Lyon qui se charge de l'identification de l'espèce. La méthode de référence pour l'identification est un test immuno-enzymatique, le MF-dot (Fig. 7). Cette technique est fondée sur l'utilisation de microplaques contenant 96 puits, dont le fond est constitué d'une membrane poreuse sur laquelle les mycoplasmes se fixent après filtration. Des anticorps spécifiques de chaque espèce mycoplasmique sont filtrés, puis des anti-IgG marqués à la peroxydase, se fixent sur les anticorps. Une réaction colorimétrique est donc synonyme d'une fixation antigène-anticorps [84].

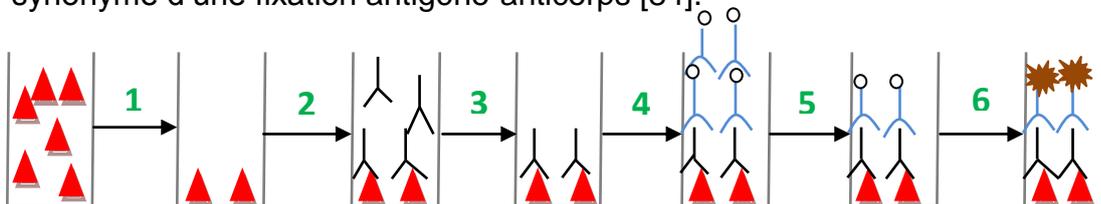


Figure 7. Principe du MF-dot.

▲, antigène de surface des mycoplasmes ; Y, anticorps ; Y (bleu), conjugué type anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase ; * (orange), réaction colorimétrique ; **1**, solution de blocage (TBS + 10% de sérum de cheval) ; **2**, sérum hyper-immuns ; **3**, quatre cycles de lavage-vidange ; **4**, conjugué (couplé à la peroxydase) ; **5**, quatre cycles de lavage-vidange ; **6**, solution de révélation (TBS + 0,05% DAB + 0,1% H₂O₂).

III.2.c. Perspectives d'évolution : Electrophorèse sur gel avec un gradient dénaturant (DGGE) et rtPCR

Etant donné que l'identification par la technique de MF-dot ne peut être faite que dans un laboratoire spécialisé, les laboratoires vétérinaires sont à la recherche d'autres techniques d'analyses réalisables sur place. Le laboratoire animateur de VIGIMYC, l'Anses Lyon, teste régulièrement de nouvelles méthodes comme l'Electrophorèse sur Gel avec un Gradient Dénaturant (DGGE) [104] ou la technique de spectrométrie de masse MALDI TOF [27, 79], voire en développe comme la

rtPCR AC (pour le diagnostic du groupe « *mycoides* » responsable de l'Agalactie Contagieuse) [12].

La DGGE a l'avantage d'être plus sensible que la méthode de référence, le MF-dot. Elle est en revanche moins spécifique que ce dernier, du fait de l'identification de *M. capricolum* et du groupe « *mycoides* » uniquement (Tab.II).

Tableau II. Comparaison entre le MF-dot et la DGGE pour l'identification des mycoplasmes des ruminants [84, 88, 104].

	MF-dot	DGGE
Avantages	Possible identification de toutes les espèces de mycoplasmes Spécificité assez bonne	Rapide Indépendant de la culture Standardisation facile Sensibilité bonne
Inconvénients	Long Dépendant de la culture Réactions sérologiques estimées visuellement (standardisation difficile) - Réactions croisées entre espèces - Réactions différentes d'une souche à une autre d'une même espèce (composition antigénique de surface hétérogène au sein d'une même espèce) Sensibilité moyenne	Spécificité faible : identification de <i>M. capricolum</i> et du groupe " <i>mycoides</i> " uniquement

Cependant, ces deux techniques d'identification, le MF-dot et la DDGE, restent des techniques fastidieuses et longues à réaliser. Les techniques de biologie moléculaire représentent donc une perspective d'évolution très prometteuse pour le diagnostic des mycoplasmoses des petits ruminants en ciblant des gènes spécifiques d'espèces pour leur détection. En effet, la technique de rtPCR mise au point dernièrement dans l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants de l'Anses Lyon permet d'identifier *Ma* individuellement d'une part et le groupe « *mycoides* » (*Mmc*, *Mcc* et *Mp*) d'autre part. Cette technique a une très bonne sensibilité et spécificité [12]. Mais, seuls *Ma* et le groupe « *mycoides* » sont recherchés par cette méthode ciblant essentiellement les agents pathogènes de l'agalactie contagieuse, et les autres mycoplasmes pouvant être présents ne sont pas recherchés. Il s'agit uniquement d'une méthode de diagnostic ciblée et non une méthode d'identification large comme le MF-dot et la DGGE. Cependant, cette technique présente un intérêt majeur : un grand nombre d'échantillons peut être analysés simultanément en un temps réduit, l'étape difficile de mise en culture n'étant pas nécessaire. La réponse donnée au vétérinaire est donc beaucoup plus rapide, ceci pouvant augmenter la demande des vétérinaires, qui pourront alors mettre en place un traitement contre les mycoplasmes plus rapidement. Il est donc intéressant de savoir si les laboratoires seraient prêts à utiliser de telles méthodes pour le diagnostic des mycoplasmoses des petits ruminants, certains l'utilisant déjà pour les mycoplasmoses bovines, et d'évaluer la faisabilité de l'utilisation de la rtPCR pour un suivi d'élevage caprin atteint d'agalactie contagieuse.

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

L'étiologie de l'agalactie contagieuse est multiple, la clinique protéiforme, l'infection peut être chronique et asymptomatique, le diagnostic reste difficile et laborieux, le traitement antibiotique est souvent peu efficace à long terme et la prophylaxie sanitaire est difficile et ingrate. Toutes ces particularités participent aux difficultés de maîtrise de cette maladie. Il est donc nécessaire de mettre en place et de perfectionner des méthodes diagnostiques aussi bien pour l'assainissement que la prévention. L'essor des techniques de biologie moléculaire observé ces dernières décennies offre de nouvelles possibilités de diagnostic rapide et ciblé. Ainsi, l'utilisation de la PCR a été évaluée dans les laboratoires vétérinaires français et la faisabilité de cette technique pour un suivi d'élevage atteint d'agalactie contagieuse a été étudiée.

Chapitre I : Evaluation de la place des techniques de PCR pour le diagnostic des mycoplasmoses de ruminants dans les laboratoires vétérinaires en France

I. Objectifs et contexte

Le réseau VIGIMYC a effectué 357 identifications d'isolats mycoplasmiques de ruminants pour l'année 2011 qui se répartissaient sur 51 départements et qui provenaient de 34 laboratoires. Le nombre annuel d'isolats reçus pour identification n'a pas évolué de façon significative lors des quatre dernières années toutes filières confondues. La répartition par espèce animale s'est en revanche modifiée suite à la très faible part d'isolats provenant de la faune sauvage, après un fort épisode de mortalité en 2008, l'augmentation du contingent caprin en 2012 et la diminution du contingent bovin depuis 2007 (Fig. 8) [87, 89]. Or, aujourd'hui, avec la prise en charge directe par les laboratoires, notamment par des techniques de PCR, de l'identification de certains mycoplasmes, le diagnostic des mycoplasmoses des ruminants entre dans une phase de mutation qui risque de remettre en cause l'existence du réseau. Ainsi les objectifs de cette étude sont d'évaluer la place des techniques de PCR pour le diagnostic des mycoplasmoses de ruminants dans les laboratoires vétérinaires en France et de savoir si les laboratoires membres de VIGIMYC envisagent d'utiliser la PCR pour l'identification des mycoplasmes. Ceci permettrait de savoir si des analyses échappent au réseau VIGIMYC et d'appréhender l'ampleur et l'immédiateté d'une mutation en matière de méthodes de diagnostic pour l'accompagner et donc proposer une nouvelle méthodologie de surveillance.

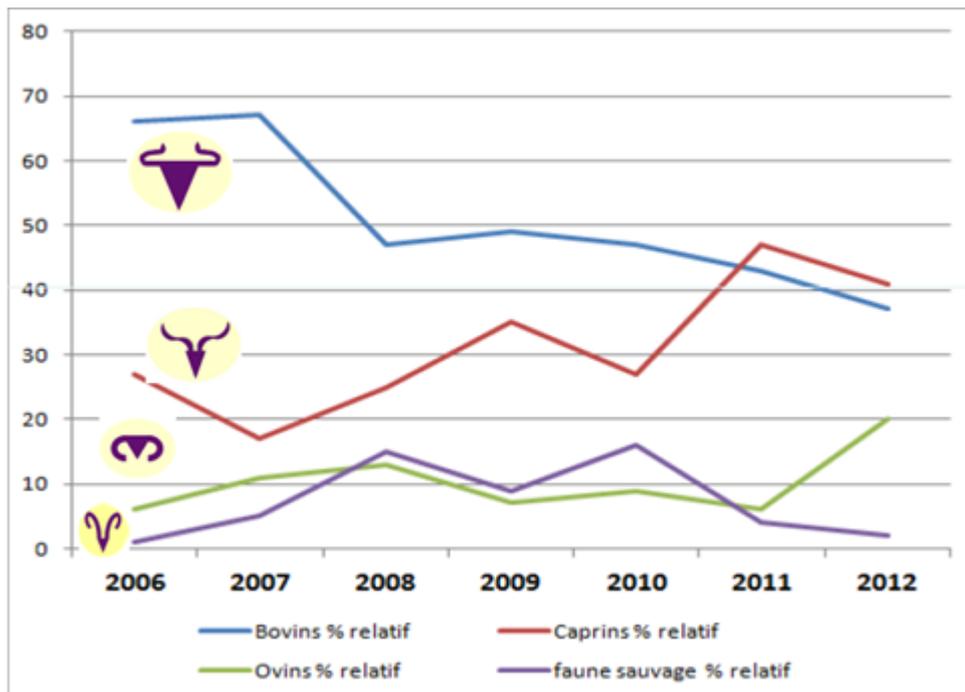


Figure 8. Evolution sur sept ans du pourcentage de prélèvements reçus par le réseau VIGIMYC selon l'espèce animale [86].

II. Matériel et méthodes

II.1. Principe

Un auto-questionnaire a été envoyé par la poste à un échantillon de laboratoires français identifiés comme réalisant des analyses vétérinaires. Il était accompagné au recto d'un texte de présentation avec l'adresse du laboratoire destinataire, nous permettant de savoir quel laboratoire avait répondu au questionnaire, et d'une enveloppe pré-affranchie pour le renvoi du questionnaire par le laboratoire (Annexes 5 et 6). Les réponses au questionnaire ont été enregistrées dans une base de données dès réception à l'Anses Lyon. A mi-enquête, une relance téléphonique a été faite. A la date butoir de l'enquête, les questionnaires ont été triés et les réponses ont été analysées en fonction d'un certain nombre de questions préalablement formulées. Un résumé des résultats a été présenté aux laboratoires adhérant à VIGIMYC lors des Journées VIGIMYC de 2012.

II.2. Conduite de l'étude

II.2.a. Constitution de l'échantillon

Trois niveaux d'étude ont été définis :

- La population cible comprenait tous les laboratoires d'analyses vétérinaires français (Métropole et Outre-Mer).

- La population source se rapprochait le plus possible de la population cible. La liste des laboratoires a été constituée à partir de différentes sources : le RESAPATH [65], le réseau VIGIMYC [33] et l'annuaire ROY [2]. Elle comportait 112 laboratoires.

- L'échantillon était identique à la population source dans notre cas, du fait de la petite taille de cette dernière. L'auto-questionnaire a donc été envoyé à 112 laboratoires dont 41 laboratoires adhérant (charte signée) ou participant (envoi de souches sans signature de la charte) au réseau VIGIMYC (Annexe 7).

II.2.b. Informations issues des différentes sources

Les informations extraites de la base de données de RESAPATH ont été :

- Les coordonnées complètes des laboratoires ;
- Le secteur d'activité du laboratoire par filière : ruminants, porcs, volailles, animaux de compagnie.

Les informations extraites de la base de données de VIGIMYC ont été :

- Les coordonnées complètes de laboratoires ne participant pas au réseau RESAPATH ;

- L'appartenance formelle ou non au réseau VIGIMYC, c'est-à-dire la signature ou non de la charte par le laboratoire ;

- La participation *de facto* au réseau VIGIMYC pour identification, c'est-à-dire l'envoi de cultures à VIGIMYC sans avoir préalablement formalisé la collaboration par une signature de la charte.

Les informations extraites de l'annuaire ROY ont été les coordonnées complètes de laboratoires absents des deux précédentes bases de données.

II.2.c. Informations recueillies auprès des laboratoires à l'aide de l'auto-questionnaire

Les informations recueillies par cet auto-questionnaire concernaient :

- Le volume de prélèvements traités pour des analyses bactériologiques et/ou mycoplasmiques en 2011 de bovins, ovins, caprins, autres ruminants et d'autres filières ;

- L'équipement en thermocycleur pour effectuer des PCR ou des rtPCR ;

- La méthode pour effectuer les analyses pour la recherche de mycoplasmes de ruminants ;

- L'envoi des cultures à VIGIMYC pour l'identification ;

- La forme des rendus de résultats aux vétérinaires ;

- L'intérêt d'une technique d'analyse directe par rtPCR pour le diagnostic de certaines espèces de mycoplasmes de ruminants et les raisons ;

- L'évolution des activités diagnostiques pour les mycoplasmoses des ruminants et des autres filières dans les années à venir.

Les questions fermées ont été privilégiées pour faciliter la gestion des réponses et limiter les biais de compréhension.

II.2.d. Envoi du questionnaire et saisie des informations

Le questionnaire a été envoyé le 23 mai 2012 par courrier et une relance téléphonique a été faite le 28 Juin 2012. Les réponses ont été prises en compte jusqu'au 1^{er} août 2012. Les données ont été recueillies par retour du questionnaire par courrier postal ou électronique, ou par la prise des réponses par téléphone. Les informations ont été saisies dès le retour des questionnaires à l'Anses Lyon dans une base de données Excel (une ligne par laboratoire et une colonne par modalité de réponse). Un codage numérique a été mis en place pour chaque réponse.

II.2.e. Mode de tri des données

A partir de la population source, plusieurs tris ont été réalisés pour constituer la population étudiée (Fig. 9).

Tous les commentaires ont été étudiés au cas par cas, notamment les questions posées par les laboratoires. Les réponses ont été données aux laboratoires avec les résultats de l'enquête aux Journées VIGIMYC de 2012.

II.2.f. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été faites à différents niveaux : tout d'abord, elles ont permis de vérifier la qualité des données, puis une analyse détaillée du groupe « Mycoplasmes » a été réalisée (Annexe 8), permettant de répondre à plusieurs questions, suivie d'une analyse de certaines données du groupe « Non Mycoplasmes ». Pour effectuer ces analyses, des tableaux de variables ont été réalisés pour chaque groupe [102] et un test de Fischer a été réalisé.

III. Résultats

L'ensemble des données a été analysé, dans un premier temps, pour établir une dichotomie et donc isoler les laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques et vérifier la qualité de toutes les données récoltées. Dans un deuxième temps, seules les données des laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques ont été étudiées.

III.1. Analyse des données

Une première dichotomie a été faite en fonction de la réponse ou non du laboratoire au questionnaire (Fig. 9). Nous avons obtenu ainsi deux groupes : l'un appelé « les Non Répondants » comprenant les laboratoires n'ayant pas renvoyé le

questionnaire par courrier ou par mail et n'ayant pas pu être joints par téléphone, et l'autre appelé les « Répondants » comprenant les laboratoires ayant donné suite au questionnaire. Le taux de réponse a été calculé à partir de cette première dichotomie. Parmi les « Répondants », une deuxième dichotomie a ensuite été faite en fonction de l'activité générale du laboratoire en 2011 (Ruminants ou Non Ruminants) et des informations remplies par le laboratoire sur le questionnaire. Les deux sous-groupes obtenus représentaient pour l'un, appelé les « Non Ruminants », les laboratoires ne travaillant pas en filière ruminants et ceux n'ayant pas du tout complété le questionnaire, et pour l'autre, appelé les « Ruminants », tous les autres laboratoires. Parmi ce dernier groupe, une troisième dichotomie a été appliquée pour rendre compte de la recherche ou non des mycoplasmes au sein du laboratoire : d'une part les « Non Mycoplasmes » représentant les laboratoires ne recevant pas de demande d'analyses mycoplasmiques et ceux les sous-traitant entièrement et d'autre part les « Mycoplasmes » représentant les laboratoires effectuant les analyses mycoplasmiques et ceux sous-traitant les analyses mais envoyant la réponse au praticien.

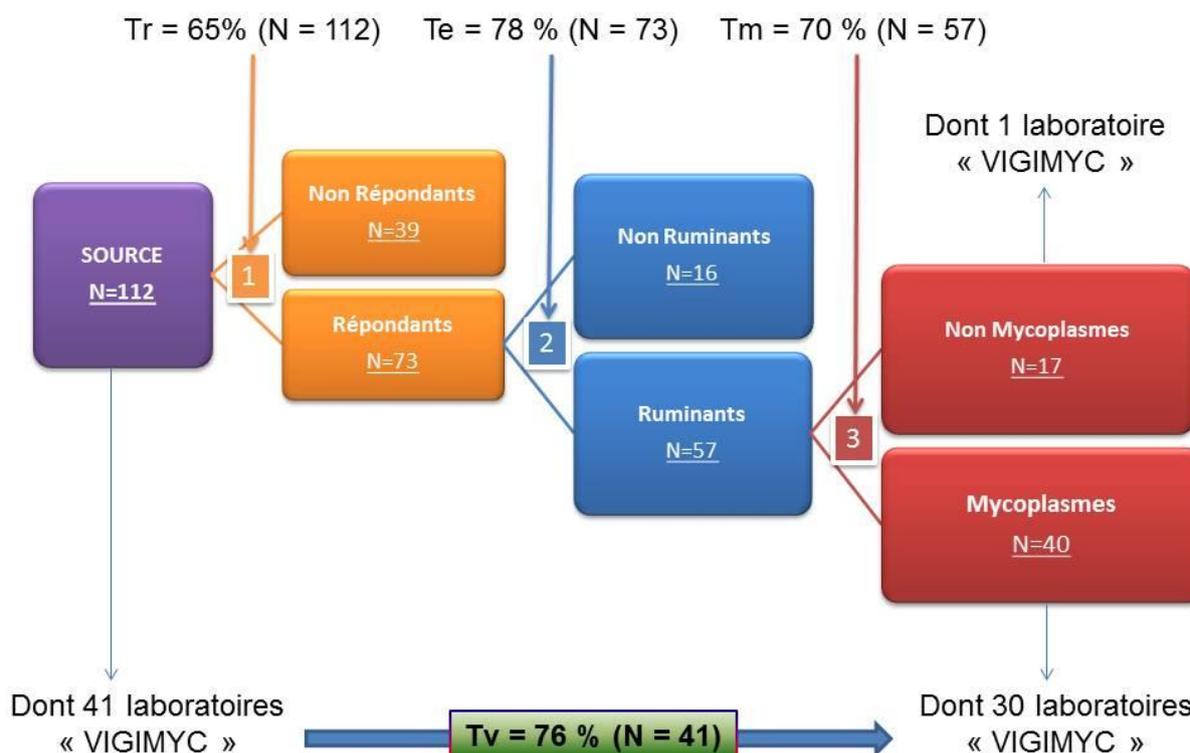


Figure 9. Dichotomies permettant la distribution des laboratoires à partir de la source (laboratoires destinataires du questionnaire) en différents échantillons.

1, première dichotomie en fonction des laboratoires ayant répondu (appelés « Répondants ») ou non (appelés « Non Répondants ») au questionnaire par courrier, mail ou téléphone ; 2, deuxième dichotomie en fonction de la réalisation par les laboratoires d’analyses de ruminants en 2011 (appelés « Ruminants ») ou non (appelés « Non Ruminants ») incluant les laboratoires n’ayant pas complété le questionnaire) ; 3, troisième dichotomie en fonction de la recherche ou non des mycoplasmes (respectivement appelés « Mycoplasmes » ou « Non Mycoplasmes ») au sein des laboratoires. N, nombre de laboratoires concernés dans chaque échantillon. Laboratoires « VIGIMYC », laboratoires adhérant ou participant au réseau VIGIMYC ; Tr, Taux de réponse ; Te, Taux de laboratoires effectuant des analyses de ruminants ; Tm, Taux de laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques de ruminants ; Tv, Taux de réponse des laboratoires adhérant ou participant au réseau VIGIMYC.

III.2. Vérification de la qualité des données analysées

III.2.a. Taille et représentativité de l’échantillon

Parmi les 112 autoquestionnaires envoyés, 73 nous ont été retournés par courrier postal, électronique ou retranscrits lors d’un entretien téléphonique. Le taux de réponse (Tr) était donc de 65%. Sur les 73 laboratoires ayant répondu, 57 (Te=78%) effectuaient des analyses de ruminants et sur ces 57 laboratoires, 40 (Tm=70%) effectuaient des analyses mycoplasmiques (Fig. 9).

Les laboratoires principalement visés par cette étude étaient ceux adhérant (charte signée) ou participant au réseau VIGIMYC (envoi de souches sans signature de la charte). Au total, 41 laboratoires avaient signé la charte du réseau ou envoyaient régulièrement des souches sans avoir signé la charte. Parmi ces 41 laboratoires, 31 (Tv=76%) avaient répondu au questionnaire et parmi les 10 laboratoires n'ayant pas répondu seuls 3 (7%) avaient signé la charte. L'objectif d'inclure au maximum dans la population cible les laboratoires VIGIMYC a donc été atteint.

III.2.b. Traitement des écarts au protocole

Les données auraient dû toutes être récoltées après réception des questionnaires par courrier mais, lors de la relance téléphonique, 9 laboratoires ont souhaité répondre au questionnaire par téléphone. Tous ces laboratoires ont été comptabilisés dans les « Répondants » pour ne pas perdre les renseignements pris par téléphone mais ils se sont avérés tous appartenant au groupe « Non Ruminants ». Les biais liés à l'enquêteur et les biais de déclaration liés au sujet ne sont donc pas intervenus dans l'étude du groupe « Ruminants ».

Un questionnaire nous a été renvoyé sans précision de l'expéditeur : nous n'avons reçu que le questionnaire sans le recto avec l'adresse du laboratoire destinataire.

III.2.c. Recherche des perdus de vue par rapport aux « Non Répondants »

Parmi les 39 laboratoires « Non Répondants », 2 courriers (soit 6%) nous ont été retournés avec la mention « N'habite pas à l'adresse indiquée » du fait de la fermeture du laboratoire. Ceci a permis la mise à jour des différentes bases de données utilisées pour constituer la population source et donc l'échantillon.

La relance téléphonique nous a permis de préciser un motif de non-réponse, à mi-parcours : l'arrêt de l'activité en santé animale pour 1 laboratoire (3%).

III.2.d. Contrôle de cohérence

La cohérence des réponses données par les laboratoires a été vérifiée en analysant de façon croisée les informations recueillies. Par exemple :

- Sur 19 laboratoires ayant coché « trop peu de prélèvements à analyser » dans la question V. du questionnaire (traitant des raisons de l'utilisation ou non de la rtPCR par les laboratoires pour les analyses mycoplasmiques), seulement 3 ont déclaré effectuer plus de 50 analyses mycoplasmiques par an sur des prélèvements provenant de bovins et aucun laboratoire n'a déclaré en effectuer plus de 50 sur des prélèvements de petits ruminants.
- Parmi les 8 laboratoires utilisant la PCR pour leurs analyses mycoplasmiques, tous sont équipés d'au moins un type de thermocycleur.

- Parmi les 16 laboratoires ayant déclaré envoyer régulièrement leur culture pour identification à VIGIMYC, 15 (soit 94%) ont effectivement signé la charte de VIGIMYC ou sont enregistrés comme envoyant des souches sans signature de la charte. La concordance dans les réponses concernant l'envoi ou non des souches à VIGIMYC par rapport aux données VIGIMYC a été évaluée plus spécifiquement (Fig. 10).

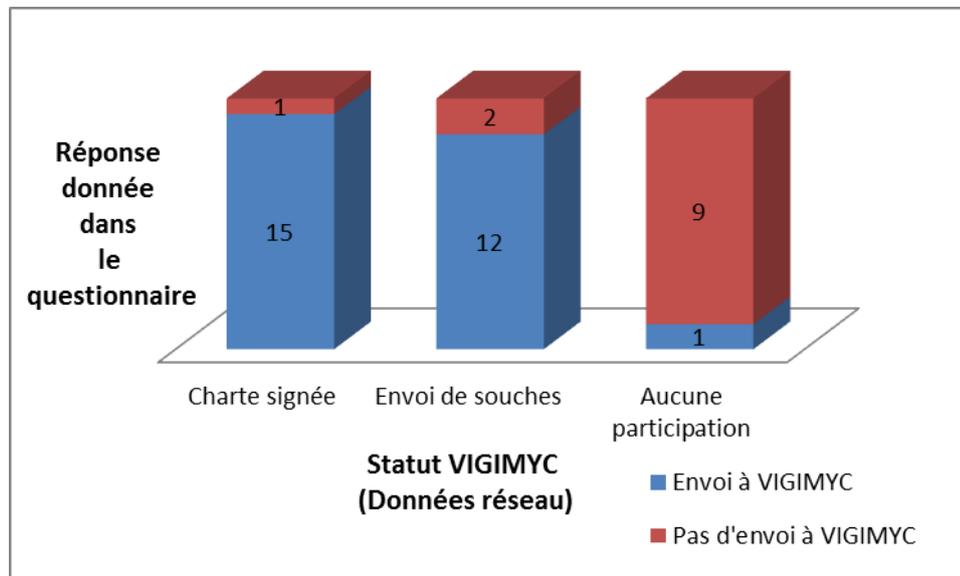


Figure 10. Réponse donnée à la question III. par les laboratoires à propos de l'envoi des souches en fonction de leur statut au sein de VIGIMYC.

L'histogramme représente la concordance entre la réponse fournie par le laboratoire et les informations enregistrées dans la base de données de VIGIMYC. Statut VIGIMYC, informations sur la participation à VIGIMYC des laboratoires d'après la base de données du réseau ; Charte signée, laboratoire ayant signé la charte du réseau ; Envoi de souches, laboratoire envoyant des souches sans avoir signé la charte ; Aucune participation, laboratoire n'ayant pas signé la charte et n'envoyant pas de souches ; Réponse donnée : Envoi à VIGIMYC, laboratoire ayant répondu qu'il envoyait les souches au réseau VIGIMYC ; Réponse donnée : Pas d'envoi à VIGIMYC, laboratoire ayant répondu qu'il ne les envoyait pas. Nombre de laboratoires dont on a la réponse = 40.

Sur 16 laboratoires étant enregistrés comme ayant signé la charte de VIGIMYC, seulement un laboratoire (6%) a répondu qu'il n'envoyait pas ses souches à VIGIMYC. Sur les 14 enregistrés comme « envoyant des souches sans signature de la charte », deux laboratoires (14%) ont répondu qu'ils n'envoyaient pas leurs souches à VIGIMYC. Enfin, sur les 10 laboratoires n'étant pas enregistrés dans VIGIMYC, un laboratoire (10%) a répondu qu'il envoyait ses souches à VIGIMYC. Un test de Fischer a été réalisé pour vérifier la concordance entre la réponse donnée par le laboratoire au questionnaire et le statut enregistré dans la base de données du réseau VIGIMYC. La p-value était de 6.10^{-6} , elle était donc inférieure au seuil de sécurité $\alpha=0,05$. Les résultats n'étaient donc pas concordants, il existait donc une différence significative entre la réponse donnée par le laboratoire au questionnaire et le statut enregistré dans la base de données du réseau VIGIMYC. Ce biais de réponse était probablement dû au fait que les personnes ayant répondu au questionnaire ne connaissaient pas le statut du laboratoire par rapport au réseau. Dans la suite de l'étude, nous avons conservé le statut des laboratoires au sein de

VIGIMYC enregistré dans la base de données du réseau et non de la réponse donnée par le laboratoire sur le questionnaire, du fait de la mise à jour de la base de données à chaque envoi de souches au réseau.

III.2.e. Analyse des biais a posteriori

Le biais de non réponse est représenté par 39 laboratoires qui n'ont pas répondu au questionnaire, mais nous avons considéré que l'échantillon de « Répondants » était représentatif de la population cible avec notamment 31 laboratoires parmi les 41 adhérant ou participant à VIGIMYC.

Quatre laboratoires ont renvoyé le questionnaire sans l'avoir rempli et ont précisé que ce n'était pas ou plus des laboratoires d'analyses, il s'agit d'un biais de sélection. Ces laboratoires n'ont pas été pris en compte dans le groupe « Répondants ».

Comme mentionné plus haut, une relance téléphonique a été effectuée et certaines réponses de laboratoires (9 laboratoires) ont été prises par téléphone, ce qui aurait pu engendrer un biais. Mais ces laboratoires n'effectuaient pas d'analyses pour les ruminants, ils ont donc été classés dans le groupe des « Non Ruminants ».

Des modifications ont été faites au niveau des modalités de saisie dans la base de données par rapport aux retours tels que :

- le rajout de la modalité « équipement en thermocycleur pour la PCR classique et la rtPCR » pour la question II. (traitant de l'équipement en thermocycleur) ;
- pour les questions III. et V. (traitant respectivement du traitement des demandes d'analyses mycoplasmiques et des raisons de l'utilisation ou non de la rtPCR pour les analyses mycoplasmiques), des précisions étaient demandées dans le cas où aucune des réponses proposées ne correspondait au laboratoire. Pour chaque précision, une modalité a été créée dans la base de données ;
- il aurait été nécessaire de distinguer les filières dans les questions III. et IV. (cette dernière traitant du rendu des résultats) mais les laboratoires concernés l'ont précisé, des modalités ont donc été rajoutées ;
- le rajout de la modalité « présence/absence uniquement » pour le rendu des résultats pour la question IV. ;
- le rajout de la modalité « oui et non » à propos de l'intérêt pour la rtPCR pour la question V.
- pour la question V., des biais de compréhension ont été observés : de nombreux laboratoires n'ont pas fait le classement et ont seulement coché les cases, d'autres ont mis plusieurs fois le même rang, il a donc été décidé de ne pas prendre en compte le classement et de le remplacer par les modalités « coché » ou « non coché » uniquement.

Dans la question I. (traitant des volumes d'analyses bactériologiques et mycoplasmiques des laboratoires), le choix « aucune analyse » était manquant. Certains laboratoires l'ont précisé mais ils ont été comptabilisés dans les laboratoires ayant coché « inférieur à 10 » pour ne pas créer de biais de réponse car certains

laboratoires ont probablement coché « inférieur à 10 » par défaut, alors qu'ils font sans doute « aucune analyse » si l'on considère leur réponse à la question III. (« Vous ne recevez pas de demande » cochée).

Malgré nos efforts à la conception du questionnaire, certaines questions n'étaient pas des questions suffisamment fermées, ce qui a entraîné des biais de compréhension. Pour 4 laboratoires, la réponse à la question III. (traitant du traitement des demandes d'analyses mycoplasmiques) n'était pas cohérente avec la réponse à la question IV. (traitant du rendu des résultats des analyses), un mail a donc été envoyé aux 4 laboratoires leur demandant des précisions, pour 2 d'entre eux il s'agissait d'erreurs de compréhension, qui ont été corrigées, pour 1 autre cela manquait juste de précision et pour le quatrième nous n'avons pas eu la réponse, aucune modification n'a été faite.

Les questions IV. et V (traitant respectivement du rendu des analyses mycoplasmiques et des raisons de l'utilisation ou non de la rtPCR pour les analyses mycoplasmiques) ont entraîné des biais de compréhension : la modalité « réponse envoyée au praticien par le laboratoire à qui les analyses mycoplasmiques sont sous-traitées » aurait dû figurer pour éviter des incompréhensions. Quatre laboratoires avaient répondu à la question alors que dans les questions précédentes ils spécifiaient qu'ils ne faisaient pas d'analyses mycoplasmiques parce qu'ils n'en recevaient pas ou qu'ils sous-traitaient. Un seul de ces laboratoires sous-traitait les analyses mycoplasmiques et envoyait le résultat au praticien mais celui-ci avait indiqué dans la question I. qu'il traitait des analyses mycoplasmiques contrairement aux trois autres. Dans la question V., le terme « directe » n'a pas été assez mis en évidence et l'avantage « prix de revient par analyse » n'était pas assez explicite et a été compris comme « prix de revient des réactifs », mais les laboratoires l'ayant coché avaient précisé qu'ils le comprenaient comme un désavantage, leur réponse n'a donc pas été prise en compte dans la base de données.

III.3. Analyse du groupe « Mycoplasmes »

Nous allons tout d'abord décrire les caractéristiques générales de l'échantillon de laboratoires déclarant effectuer des analyses mycoplasmiques.

III.3.a. Caractéristiques générales

Les analyses statistiques effectuées ci-après ont été effectuées à partir de l'analyse des données brutes du groupe « Mycoplasmes » composés de 40 laboratoires. Chaque question du questionnaire a permis de répondre à un sujet spécifique (Annexe 8).

- *Comment se répartissent les laboratoires « Mycoplasmes » en fonction des bassins d'élevage ?*

Nous remarquons que les laboratoires effectuant des analyses bactériologiques sur des prélèvements de ruminants se trouvent logiquement dans les moyens et grands bassins d'élevage (Fig. 11). De plus, tous les laboratoires se situant dans les grands bassins d'élevage bovins, tels que la Côte d'Armor, l'Ille et Vilaine, la Manche, la Mayenne, la Maine et Loire, la Vendée, l'Allier et la Saône et Loire, ainsi qu'au niveau du grand bassin d'élevage caprin qu'est la région Poitou-Charentes, effectuent des analyses mycoplasmiques.

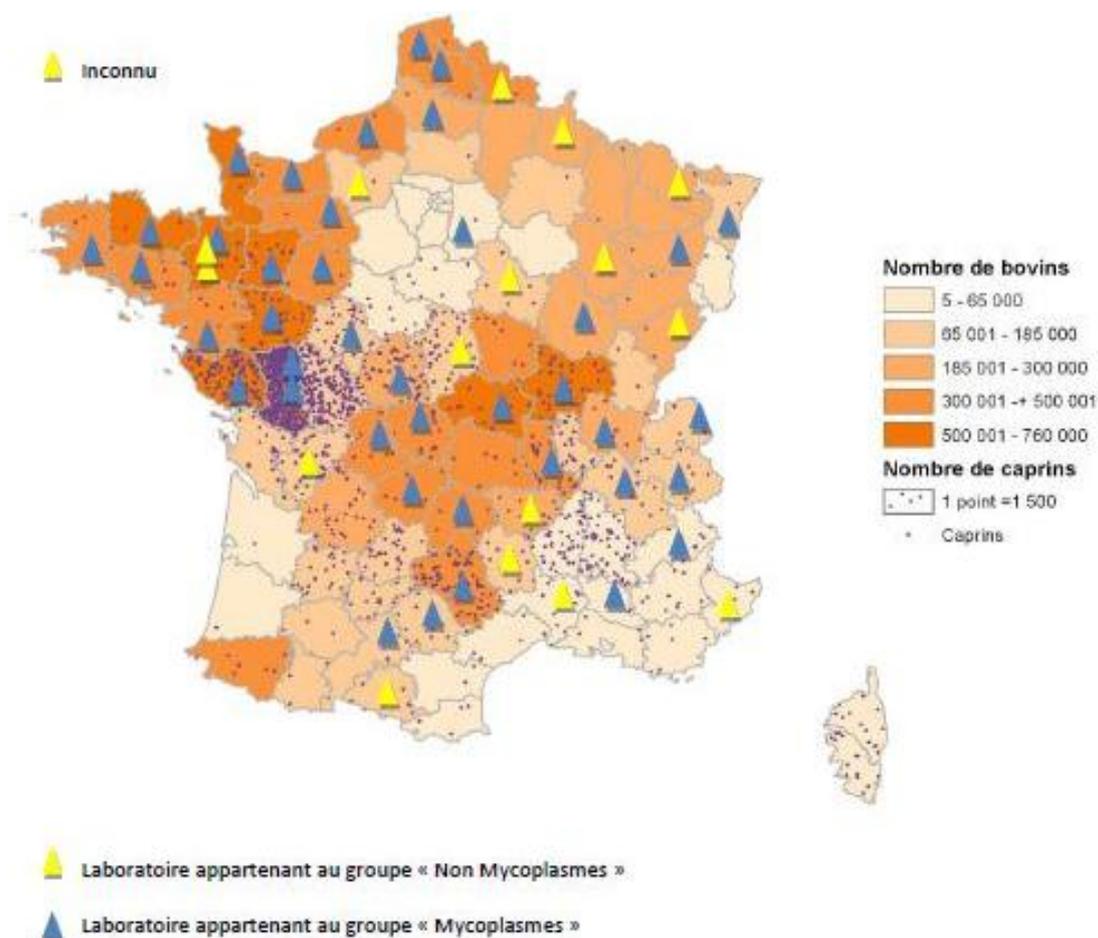


Figure 11. Cartographie de la population des bovins et caprins en 2011 en France et répartition des laboratoires ayant répondu au questionnaire et effectuant des analyses bactériologiques sur des prélèvements provenant de ruminants.

Données agreste issues du recensement agricole de 2011. Laboratoire appartenant au groupe « Non Mycoplasmes », laboratoire vétérinaire n'effectuant pas d'analyses mycoplasmiques ; Laboratoire appartenant au groupe « Mycoplasmes », laboratoire vétérinaire effectuant des analyses mycoplasmiques ; Inconnu, laboratoire ayant renvoyé le questionnaire sans le recto avec son adresse empêchant son identification et donc sa localisation [72].

- *Quelle est la participation à VIGIMYC ?*

L'enquête visait tout particulièrement les laboratoires adhérant ou participant à VIGIMYC. Parmi les 40 laboratoires du groupe « Mycoplasmes », 73 % (n=30) étaient *de facto* adhérents ou participants à VIGIMYC. Si l'on compare ces chiffres avec ceux de la population source, sur 112 laboratoires dans la population source, seulement 37% (n=41) des laboratoires faisaient partie de VIGIMYC. Et comme dit précédemment, parmi les 41 laboratoires adhérant ou participant à VIGIMYC, 31 (76%) ont répondu au questionnaire et 30 de ces laboratoires ont été classés dans le groupe « Mycoplasmes ». Ainsi, les données brutes analysées ici correspondaient pour les trois quarts à des résultats de laboratoires adhérant ou participant au réseau VIGIMYC.

- *Quel volume d'analyses traitent les laboratoires ? (Question 1.)*

Dans toutes les filières, à l'exception de la filière bovine, la majorité des laboratoires ont affirmé traiter un faible nombre d'analyses bactériologiques et mycoplasmiques en particulier. En filière bovine, la majorité des laboratoires ont déclaré effectuer un grand nombre d'analyses bactériologiques.

Dans chaque filière, un plus grand nombre de laboratoires vétérinaires effectuent moins de 10 analyses mycoplasmiques par an par rapport aux laboratoires effectuant moins de 50 analyses bactériologiques et réciproquement, il y a plus de laboratoires effectuant un grand nombre d'analyses bactériologiques (plus de 100 par an) que de laboratoires qui effectuent beaucoup d'analyses mycoplasmiques (plus de 50 par an).

D'après la figure 12, on peut voir qu'il y a très peu de laboratoires effectuant beaucoup d'analyses mycoplasmiques pour des ruminants et en particulier pour les petits ruminants, les analyses mycoplasmiques ne représentent donc qu'une petite partie des analyses bactériologiques. On peut légèrement nuancer pour les analyses de prélèvements de bovins, où il semble que plusieurs laboratoires effectuent un grand nombre d'analyses mycoplasmiques pour cette espèce.

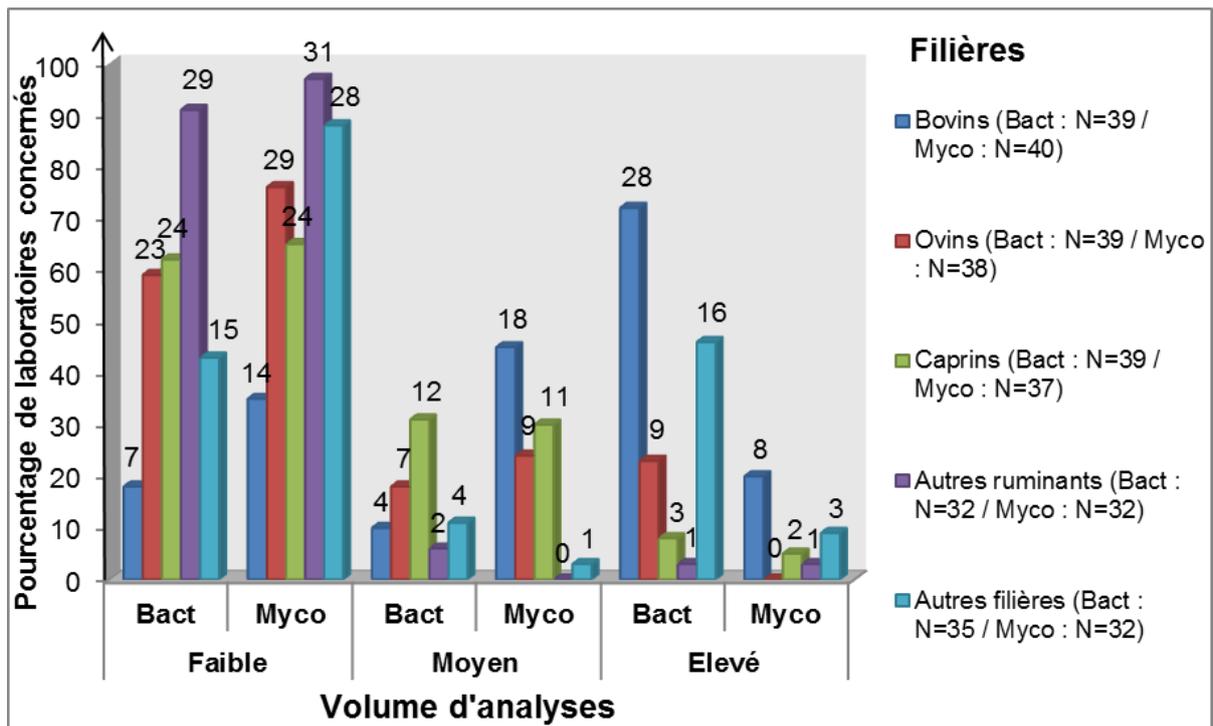


Figure 12. Pourcentage de laboratoires effectuant des analyses bactériologiques et de ceux effectuant des analyses mycoplasmiques en fonction de la filière et du volume d'analyses.

Bact, analyses bactériologiques ; Myco, analyses mycoplasmiques ; Faible, laboratoires effectuant moins de 50 analyses bactériologiques par an ou moins de 10 analyses mycoplasmiques par an ; Moyen, laboratoires en effectuant respectivement entre 50 et 100 ou entre 10 et 50 ; Elevé, laboratoires en effectuant respectivement plus de 100 ou plus de 50 ; N, nombre de laboratoires ayant répondu à la question ; nombre au-dessus de chaque colonne, nombre de laboratoires concernés.

III.3.b. Les techniques de PCR sont-elles utilisées dans les laboratoires pour les analyses mycoplasmiques ?

- *Quelles méthodes utilisent-ils pour leurs analyses mycoplasmiques ? (Question III.)*

La majorité (n=29) des laboratoires de groupe « Mycoplasmes » recherchent les mycoplasmes exclusivement par une mise en culture mais parmi ceux-ci 5 n'envoient pas leur souche à VIGIMYC. Quinze pourcent (n=6) mettent en culture pour les prélèvements provenant de petits ruminants et utilisent la rtPCR pour les prélèvements provenant de bovins et parmi ceux-ci 2 n'envoient pas leur culture à VIGIMYC. Cinq pourcent (n=2) utilisent exclusivement des analyses de PCR ou de rtPCR et 8% (n=3) utilisent d'autres techniques tels que l'étude des critères biochimiques ou le Pulmotest ou bien sous-traitent leurs analyses mais envoient le résultat au praticien (Fig. 13). La PCR est donc faiblement utilisée par les laboratoires pour les analyses mycoplasmiques. Les laboratoires mettant en culture et n'envoyant pas leur souche à VIGIMYC avec ceux utilisant la PCR, la rtPCR, les critères biochimiques ou le Pulmotest représentent plus de 40% (n=17) de notre échantillon. Les analyses mycoplasmiques effectuées dans ces laboratoires ne sont donc pas

prises en compte dans les données d'épidémiosurveillance centralisées par le réseau VIGIMYC.

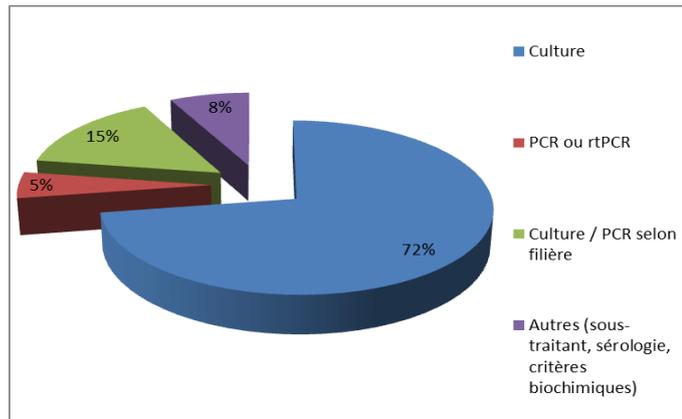


Figure 13. Pourcentage de laboratoires utilisant les différentes méthodes d'analyses.

Culture, laboratoires mettant en culture les prélèvements lors de leurs analyses mycoplasmiques ; PCR ou rtPCR, ceux utilisant la PCR ou la rtPCR ; Culture / PCR selon filière, ceux mettant en culture les prélèvements de petits ruminants et utilisant la PCR pour les prélèvements de bovins ; Autres, laboratoires sous-traitant les analyses mycoplasmiques mais envoyant la réponse au praticien, ceux mettant en culture et identifiant l'espèce par des critères biochimiques ou ceux utilisant le Pulmotest. Nombre de laboratoires dont on a la réponse = 40.

- *Sont-ils équipés pour faire de la PCR et/ou de la rtPCR ? (Question II.)*

Dans le groupe « Mycoplasmes », 37 laboratoires sur 40 (soit 93%) possèdent au moins un thermocycleur. Parmi ces 37 laboratoires, 36 (soit 90%) sont équipés d'un thermocycleur pour effectuer de la rtPCR. Dans le groupe « Répondants », 55 laboratoires sur 62 (soit 89%) possèdent au moins un thermocycleur. Parmi ces 62 laboratoires, 52 (soit 84%) sont équipés d'un thermocycleur pour effectuer de la rtPCR (Fig. 14).

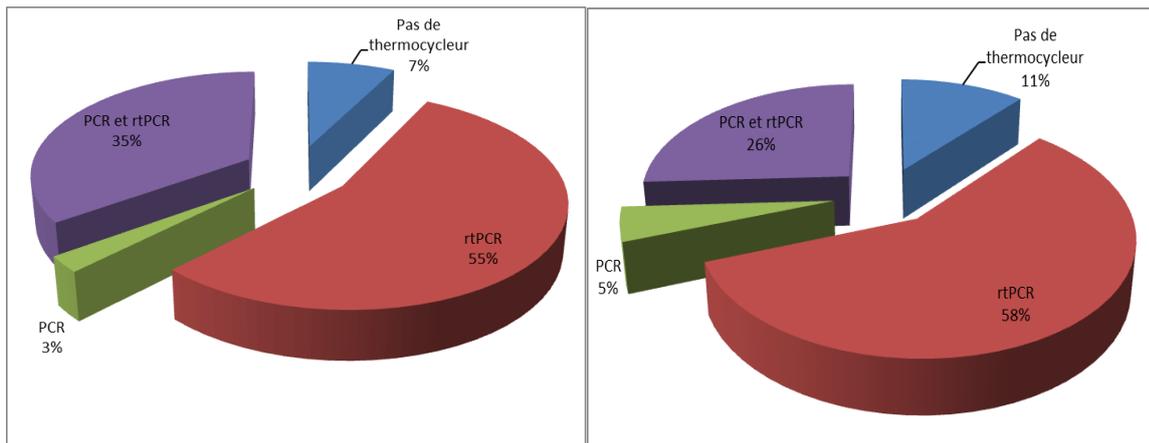


Figure 14. Equipement en thermocycleurs du groupe « Mycoplasmes » à gauche et du groupe « Répondants » à droite.

Pas de thermocycleur, le laboratoire ne possède pas de thermocycleur ; rtPCR, le laboratoire possède un thermocycleur pour de la rtPCR ; PCR, le laboratoire possède un thermocycleur pour de la PCR ; PCR et rtPCR, le laboratoire possède un thermocycleur pour de la PCR et un pour de la rtPCR. Les 40 laboratoires (100%) du groupe « Mycoplasmes » ont répondu à cette question, contrairement au groupe « Répondants » pour lequel nous avons 62 laboratoires (85%) qui ont répondu à cette question.

La plupart des laboratoires vétérinaires (89%) sont donc équipés d'au moins un thermocycleur. L'équipement en thermocycleur semble donc suffisant, et non pas un frein, dans la plupart de ces laboratoires pour la mise en place d'analyses mycoplasmiques à l'aide de technique PCR ou rtPCR.

- *Une évolution vers la rtPCR est-elle possible ? (Question II.)*

Parmi les 32 laboratoires n'utilisant pas la PCR ou la rtPCR pour leurs analyses mycoplasmiques, seulement 9% (n=3) ne possèdent aucun thermocycleur, et 91% (n=29) possèdent au moins un thermocycleur pour de la rtPCR. Une évolution vers la rtPCR semble donc possible pour ces laboratoires.

- *Pourquoi ne l'utilisent-ils pas ? Trouvent-ils un intérêt à la rtPCR pour leurs analyses mycoplasmiques ? (Question V.)*

Comme supposé, les 3 laboratoires ne possédant pas de thermocycleur ne trouvent pas d'intérêt à la rtPCR : pour l'un le prix du thermocycleur est un frein et pour les deux autres le faible nombre de prélèvements à analyser ne justifie pas d'investir dans une technique de rtPCR.

Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés uniquement aux 37 laboratoires possédant au moins un thermocycleur, pour leur connaissance des thermocycleurs et des analyses PCR et rtPCR.

Dix-huit laboratoires (49%) trouvent un intérêt à la rtPCR pour leurs analyses mycoplasmiques, 12 (32%) restent partagés et 7 laboratoires (19%) n'y trouvent pas d'intérêt.

La rtPCR semble donc présenter un intérêt certain pour les analyses mycoplasmiques pour 30 laboratoires pour différentes raisons. Pour 25 de ces

laboratoires (85 %), les raisons sont le délai de réponse et la précision de l'analyse. Viennent ensuite pour respectivement 16 (53 %) et 15 (50 %) laboratoires la possibilité de traiter un plus grand nombre d'analyses simultanément et le prix de revient par analyse.

La raison prépondérante du désintérêt des 19 laboratoires semble être le faible nombre de prélèvements à analyser pour 18 (95 %) laboratoires, vient ensuite le prix de revient des réactifs ou des kits de rtPCR pour 12 (63 %) laboratoires. Pour 4 (21 %) d'entre eux, la rtPCR est trop restreinte et il n'y a pas d'isolement de la souche. Pour 2 (11 %) laboratoires, le prix du thermocycleur est un frein à la réalisation d'analyses rtPCR bien qu'ils soient eux-mêmes équipés d'au moins un thermocycleur de rtPCR. Et un laboratoire utilise une autre technique satisfaisante : le Pulmotest.

- *Quelle est l'évolution diagnostique des laboratoires ?*

La majorité des laboratoires (67%, n=25) a déclaré que son activité diagnostique pour les mycoplasmoses de ruminants resterait stable dans les années à venir, serait en augmentation pour 30% (n=11) et serait en diminution pour 3% (n=1).

En ce qui concerne leur activité diagnostique pour les mycoplasmoses des autres filières, la majorité des laboratoires (85%, n=22) ont déclaré que son activité resterait stable, 8% (n=2) l'a estimé en augmentation et 8% (n=2) l'a estimé en diminution.

III.3.c. Quel est le lien avec VIGIMYC ?

- *Existe-t-il des analyses qui échappent à VIGIMYC ? Et si oui, pour quelle(s) raison(s) ?*

Parmi les 16 laboratoires ayant signé la charte de VIGIMYC, 88% (n=14) recherchent les mycoplasmes par culture toutes filières confondues et 12% (n=2) utilisent la culture pour les échantillons issus de petits ruminants et utilisent la PCR pour ceux de bovins. Parmi les 14 laboratoires envoyant des souches à VIGIMYC sans signature de la charte, 72% (n=10) mettent en culture toutes filières confondues, 21% (n=3) mettent en culture pour les échantillons de petits ruminants et utilisent la PCR pour ceux de bovins et 7% (n=1) mettent en culture puis identifient l'espèce sur des critères biochimiques. Parmi les 10 laboratoires ne participant pas à VIGIMYC, 50% (n=5) mettent en culture, 20% (n=2) utilisent uniquement la PCR ou rtPCR, 10% (n=1) sous-traitent uniquement les analyses, 10% (n=1) mettent en culture pour les échantillons de petits ruminants et utilisent la PCR pour ceux de bovins et 10% (n=1) utilisent le Pulmotest (Fig. 15).

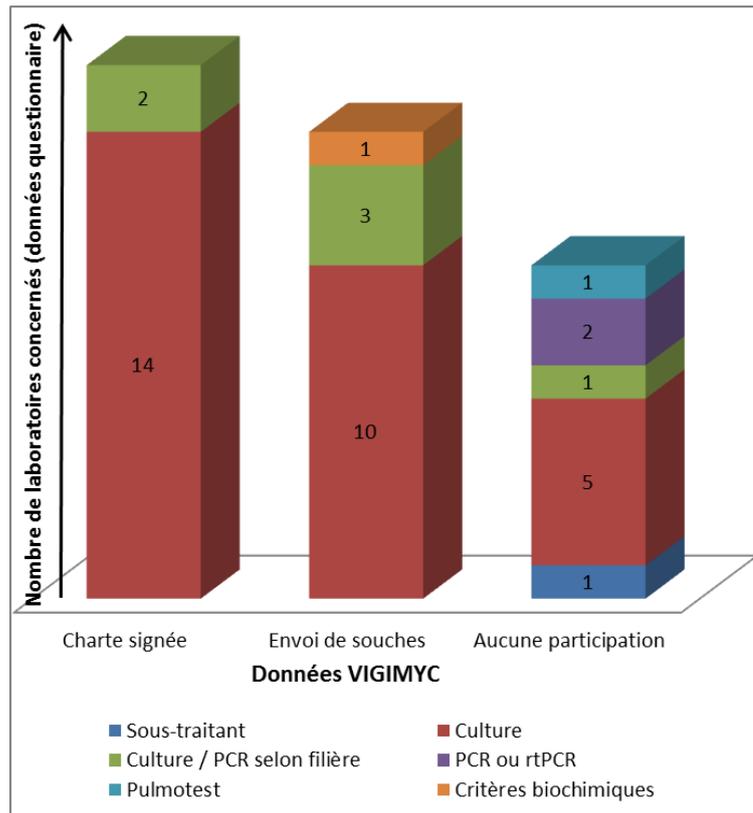


Figure 15. Méthodes d'analyses utilisées par les laboratoires en fonction de leur statut au sein de VIGIMYC d'après la base de données du réseau.

Charte signée, laboratoire ayant signé la charte VIGIMYC ; Envoi de souches, laboratoire envoyant des souches sans avoir signé la charte ; Aucune participation, laboratoire n'ayant pas signé la charte et n'envoyant pas de souches ; Sous-traitant, laboratoire sous-traitant les analyses mycoplasmiques mais envoyant la réponse au praticien ; Culture, mise en culture ; Culture / PCR selon filière, mise en culture pour les échantillons provenant de petits ruminants et analyse PCR pour ceux provenant de bovins ; PCR ou rtPCR, analyses PCR ou rtPCR ; Pulmotest, identification antigénique par kit ; Critères biochimiques, mise en culture et identification sur des critères biochimiques. Nombre de laboratoires dont on a la réponse = 40. Un nombre de laboratoire n'est pas significatif, le volume d'analyses mycoplasmiques traitées pouvant varier énormément d'un laboratoire à un autre : un laboratoire réalisant 10 ou 100 analyses mycoplasmiques ayant la même importance sur ce graphique. En effet, des laboratoires analysant de très nombreux prélèvements de différents départements se retrouvent dans la colonne « aucune participation ».

De nombreuses analyses ont échappé au réseau d'épidémiosurveillance VIGIMYC en 2011, toutes celles effectuées par :

- les 10 laboratoires enregistrés comme ne participant pas au réseau VIGIMYC (troisième colonne de la figure 14). Aucune de leurs analyses n'a été transmise à VIGIMYC. En filière bovine, 3 d'entre eux ont effectué moins de 10 analyses mycoplasmiques par an, 6 en ont effectué entre 10 et 50 et un en a effectué plus de 50, ce qui signifie qu'au moins 110 analyses mycoplasmiques ont échappé à VIGIMYC en filière bovine. En filières ovine et caprine, 7 et 6 respectivement en ont effectué moins de 10 et 2 dans chaque filière en ont effectué entre 10 et 50 par an. Ceci a représenté au moins 20 analyses échappant à VIGIMYC en filières petits ruminants ;

- le laboratoire effectuant l'identification mycoplasmaïque selon des critères biochimiques, celui-ci a effectué plus de 50 analyses mycoplasmaïques par an en filière bovine et moins de 10 en filières ovine et caprine ;

- les 5 laboratoires utilisant la PCR ou rtPCR pour les prélèvements de bovins et mettant en culture pour les prélèvements de petits ruminants. Les analyses pour les petits ruminants n'ont pas échappé à VIGIMYC dans ce dernier cas. En revanche, en filière bovine, 2 laboratoires ont effectué moins de 10 analyses mycoplasmaïques par an, un entre 10 et 50 et 2 plus de 50, ce qui a représenté plus de 110 analyses échappant à VIGIMYC.

Les analyses de 4 laboratoires effectuant plus de 50 analyses mycoplasmaïques par an en filière bovine (50%) ont donc échappé à VIGIMYC sur les 8 laboratoires effectuant un volume élevé d'analyses mycoplasmaïques dans cette filière. Au total, 220 analyses mycoplasmaïques au minimum ont échappé à VIGIMYC en filière bovine et plus de 20 en filière petits ruminants.

- *Quelle technique utilisent les laboratoires effectuant plus de 50 analyses mycoplasmaïques ? (Question I. et III.)*

En filière bovine, parmi les 8 laboratoires concernés, 5 mettent en culture (parmi lesquels 4 envoyaient ensuite leur culture au réseau VIGIMYC), 2 mettent en culture pour les prélèvements provenant de petits ruminants (parmi lesquels un envoyait ses cultures au réseau VIGIMYC) et utilisent des techniques de PCR pour les prélèvements de bovins et un identifie l'espèce à l'aide de critères biochimiques.

En filière caprine, les 2 laboratoires effectuant plus de 50 analyses mycoplasmaïques par an, mettent en culture et envoient leur culture au réseau VIGIMYC. Leurs analyses ont donc été prises en compte dans l'épidémiologie effectuée par le réseau VIGIMYC.

En filière ovine, aucun laboratoire n'a effectué plus de 50 analyses mycoplasmaïques par an sur des prélèvements d'ovins.

- *Sous quelle forme les laboratoires rendent leurs résultats d'analyses ? Le praticien a-t-il connaissance de l'espèce de mycoplasme isolée ? (Question IV.)*

Parmi les 38 laboratoires ayant répondu à cette question, 29 (soit 76%) rendent une pré-réponse suivie d'une réponse précisant l'espèce, 5 (soit 13%) rendent une réponse unique précisant l'espèce, 3 (soit 8%) rendent une réponse sous forme « présence ou absence » uniquement et 1 laboratoire (soit 3%) rend une réponse unique précisant l'espèce pour les analyses de bovins et une pré-réponse suivie d'une réponse précisant l'espèce pour les analyses de petits ruminants. Les rendus des résultats ne précisant pas l'espèce (8%) n'ont guère de valeur diagnostique puisqu'il existe des espèces opportunistes (*M. arginini* par exemple) dont l'isolement n'a aucune signification clinique. De plus, l'absence de précision d'espèces empêche d'adapter le traitement antibiotique pour tenir compte des

résistances intrinsèques ou acquises de chaque espèce de mycoplasmes. Or, les Broncho-Pneumonies Infectieuses Enzootiques (BPIE) sont multifactorielles chez les bovins (pasteurelles, mycoplasmes, virus respiratoire syncytial, virus parainfluenza 3, herpesvirus bovin 1, dictyocales) [56]. Les vétérinaires traitent donc les bactéries en général, y compris les mycoplasmes. Le frein aux traitements antibiotiques raisonnés est le délai de réponse des laboratoires, les vétérinaires ne pouvant pas forcément attendre la réponse pour commencer le traitement.

- *Est-il possible pour l'Anses de solliciter de nouveaux partenaires à VIGIMYC ?*

Comme dit précédemment 10 des 40 laboratoires sélectionnés comme effectuant des analyses mycoplasmiques sont enregistrés dans la base de données du réseau VIGIMYC comme ne participant pas du tout au réseau. Il serait donc facile de cibler ces 10 laboratoires, de les contacter pour les informer de l'intérêt du réseau VIGIMYC et de son adhésion, deux d'entre eux ont demandé à y adhérer suite au questionnaire. Il serait aussi judicieux de sensibiliser les laboratoires participant au réseau mais effectuant les analyses à l'aide de la PCR pour qu'ils transmettent leurs résultats à VIGIMYC. Ceci permettrait d'effectuer une épidémiosurveillance plus précise.

III.4. Analyse de l'échantillon des laboratoires « Non Mycoplasmes »

Les analyses statistiques effectuées ci-après ont été effectuées à partir de l'analyse des données brutes du groupe « Non Mycoplasmes », composé de 17 laboratoires uniquement (Fig. 9).

III.4.a. Quel volume d'analyses traitent les laboratoires ? (Question I.)

En filière bovine, la majorité des laboratoires (59%, n=10) effectuent plus de 100 analyses bactériologiques, alors qu'en filières ovine, caprine et autres ruminants, la majorité des laboratoires (respectivement 69%, 87% et 80%) effectuent moins de 50 analyses bactériologiques durant l'année 2011. Pour les autres filières, il y a presque autant de laboratoires qui effectuent moins de 50 analyses bactériologiques que ceux qui en effectuent plus de 100 en un an (respectivement 44% et 38%) (Fig. 16). Ces laboratoires n'effectuent pas d'analyses mycoplasmiques de prélèvements provenant de ruminants mais certains en effectuent pour d'autres filières (porcine, aviaire, ...). Quarante-deux pourcent (n=9) des laboratoires effectuent moins de 10 analyses mycoplasmiques, 9% (n=1) entre 10 et 50 et 9% (n=1) plus de 50 durant l'année 2011.

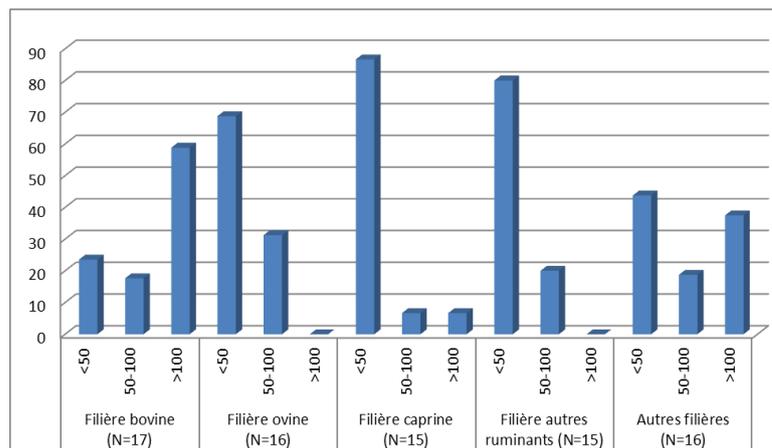


Figure 16. Pourcentage de laboratoire en fonction de la filière et du volume d'analyses bactériologiques.

<50, laboratoires effectuant moins de 50 analyses bactériologiques par an ; 50-100, laboratoires en effectuant entre 50 et 100 ; >100, laboratoires en effectuant plus de 100 ; N, nombre de laboratoires ayant répondu à la question.

III.4.b. Sont-ils équipés pour faire de la PCR et/ou de la rtPCR ? (Questions II. et V.)

Parmi les 16 laboratoires du groupe « Non Mycoplasmes » ayant répondu à cette question, 13 (soit 81%) possèdent un thermocycleur pour de la rtPCR, 2 (soit 13%) possèdent les deux types de thermocycleur et un seul (soit 6%) ne possède pas de thermocycleur (Fig. 17). Ces laboratoires sont plus équipés en thermocycleur pour effectuer de la rtPCR que le groupe « Répondants ».

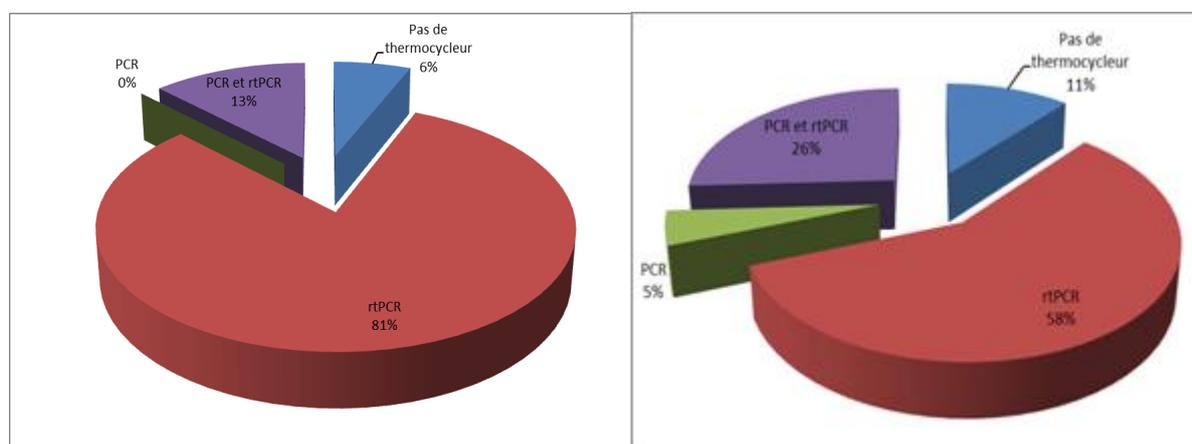


Figure 17. Equipement en thermocycleurs des laboratoires du groupe « Non Mycoplasmes » à gauche et du groupe « Répondants » à droite.

Pas de thermocycleur, le laboratoire ne possède pas de thermocycleur ; rtPCR, le laboratoire possède un thermocycleur pour de la rtPCR ; PCR, le laboratoire possède un thermocycleur pour de la PCR ; PCR et rtPCR, le laboratoire possède un thermocycleur pour de la PCR et un pour de la rtPCR. Nombre de laboratoires dont on a la réponse pour le groupe « Non Mycoplasmes » = 16/17. Nombre de laboratoires dont on a la réponse pour le groupe « Répondants » = 62/73.

Aux vues de la répartition géographique de ces laboratoires et de leur équipement en thermocycleurs, il serait possible qu'ils effectuent des analyses mycoplasmiques à l'aide de rtPCR. Et l'équipement ne représente donc pas la raison

principale pour laquelle ils n'effectuent pas des analyses mycoplasmiques, en revanche le trop faible nombre de prélèvements à analyser est la principale réponse donnée par ces laboratoires.

III.5. Analyse des commentaires

De nombreux commentaires ont été faits dans les réponses au questionnaire, certains pour préciser des éléments de réponse, d'autres pour donner un avis général sur la question des mycoplasmoses des ruminants et d'autres pour poser des questions.

Tout d'abord, plusieurs laboratoires ont spécifié qu'ils effectuaient des analyses mycoplasmiques dans d'autres filières que celle des ruminants, telles que la filière avicole, équine et celle des animaux de compagnie. Les mycoplasmoses représentent donc des pathologies d'actualité dans toutes les filières et pas uniquement chez les ruminants.

Ensuite, différentes observations ont été faites à propos de la méthode de référence utilisée pour la détection des mycoplasmes : la mise en culture. Un laboratoire a estimé que le nombre d'analyses mycoplasmiques déclinerait avec cette méthode du fait « des exigences du prélèvement, des délais et des conditions d'acheminement ». Un autre explique que le frein de cette technique est la durée de validité très courte des milieux. Un autre propose de conserver la culture pour les prélèvements de bovins tout en lui rajoutant une PCR ciblée *Mb* pour améliorer le délai de réponse. En ce qui concerne la PCR, plusieurs laboratoires pensent que l'offre peut amener la demande, cette dernière représentant un frein pour la PCR. La possibilité de réduire le délai de réponse suscite un réel intérêt. Cependant, via l'utilisation d'une PCR monospécifique, uniquement *Mb* serait identifié chez les bovins et les autres espèces de mycoplasmes ne seraient pas surveillées, notamment l'agent de la PPCB.

D'autres observations d'ordre vétérinaire ont été formulées. Quatre laboratoires ont estimé, à juste titre, que l'évolution de l'activité diagnostique des mycoplasmoses des ruminants dépendait de la sensibilisation des vétérinaires faite par les laboratoires ou la presse vétérinaire et de leur action sur le terrain. Un de ces laboratoires prévoit une stabilisation des analyses mycoplasmiques seulement si la presse vétérinaire ne met pas les mycoplasmes « à la mode », un autre espère une augmentation des analyses pour la filière bovine après une sensibilisation des vétérinaires, un autre pense qu'il est difficile de prévoir l'évolution du nombre d'analyses mycoplasmiques du fait de « la raréfaction des vétérinaires ruraux et de la disparition de nombreux élevages » et le dernier laboratoire a affirmé que le dépistage des mycoplasmes est dépendant de la conduite tenue par le vétérinaire sur le terrain.

Enfin, trois questions plus spécifiques ont été posées. La première concerne le prix de revient par analyse effectuée par rtPCR (de 5 à 15€ l'analyse). Celui-ci est très variable en fonction du nombre d'analyses effectuées simultanément, du nombre de témoins et de la nature commerciale ou non du kit. A ce prix, s'ajoute le coût

d'une extraction de l'ADN cible, certaines matrices (tel que le lait) étant extrêmement inhibitrices pour la polymérase. La deuxième question concerne la possibilité de distinguer le portage asymptomatique et la charge pathologique. Cela dépend essentiellement de la nature du prélèvement, la rtPCR permet une quantification mais ce n'est pas absolu. Enfin, un laboratoire a demandé si une réflexion pouvait s'amorcer avec les GDS pour une démarche de qualification « élevages indemnes mycoplasmes ». Un projet de ce type, mené par l'UMR Mycoplasmoses des ruminants de Lyon et l'Anses de Niort, est en cours en filière caprine, le projet MYCAPTANK [96].

IV. Discussion

IV.1. Modalités de l'enquête

Le but de cette enquête était d'évaluer l'utilisation des techniques de PCR par les laboratoires vétérinaires pour le diagnostic des mycoplasmoses de ruminants. L'autoquestionnaire a donc été envoyé à tous les laboratoires enregistrés comme effectuant des analyses vétérinaires à partir de trois bases de données : le RESAPATH, VIGIMYC et l'annuaire ROY. Les 41 laboratoires participant au réseau VIGIMYC ont reçu ce questionnaire et 31 ont répondu. Il a été envoyé à 71 autres laboratoires et 43 ont répondu. Le taux de réponse global est donc de 65 %, ce qui est un bon pourcentage. Les laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques de ruminants ont été sélectionnés et représentent dans cette étude 40 laboratoires dont 30 participant à VIGIMYC.

Cette étude a été menée à l'aide d'un auto-questionnaire permettant de recueillir différentes informations : volume de prélèvements traités pour des analyses bactériologiques et/ou mycoplasmiques en 2011 dans les différentes filières, l'équipement en thermocycleur, la méthode utilisée pour les analyses mycoplasmiques chez les ruminants, l'envoi ou non des cultures à VIGIMYC, la forme des rendus de résultats aux vétérinaires, l'intérêt pour l'utilisation de la rtPCR pour les analyses mycoplasmiques des ruminants et l'évolution des activités diagnostiques pour les mycoplasmoses des ruminants et des autres filières dans les années à venir. Bien que les questions fermées aient été privilégiées, quelques biais de compréhension ont été remarqués. Toutes les réponses possibles à chaque question n'avaient pas été envisagées. Pour corriger tous ces biais, des modalités ont été ajoutées au moment de la saisie dans la base de données pour ne pas perdre des informations.

IV.2. Résultats

Notre questionnaire a permis de cibler la majorité des laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques à partir de prélèvements de ruminants en France et

de recueillir un certain nombre d'informations en rapport avec leur activité diagnostique concernant les mycoplasmoses des ruminants. Ces 40 laboratoires se répartissent logiquement dans les grands bassins d'élevage bovins et caprins. La majorité des laboratoires effectuant des analyses mycoplasmiques de ruminants traite de faibles volumes d'analyses bactériologiques et mycoplasmiques dans la filière petits ruminants. En revanche, en filière bovine, la majorité des laboratoires effectue un volume élevé d'analyses bactériologiques et un volume de moyen à élevé d'analyses mycoplasmiques. Ces dernières ne restent donc qu'une petite part des analyses bactériologiques, en particulier dans la filière des petits ruminants. Les causes possibles sont :

- une « spécialisation de filière » des laboratoires selon les densités d'élevage dans les régions ;
- une faible incidence/prévalence des mycoplasmoses en France, difficile à objectiver ;
- une faible demande des vétérinaires, par manque de sensibilisation aux risques sanitaires des mycoplasmoses ou du fait de l'utilisation de traitements probabilistes suivis parfois de la guérison des animaux ;
- une faible demande des éleveurs, à cause d'un prix de l'animal trop faible (surtout petits ruminants) par rapport au coût des analyses ;
- une faible offre des laboratoires vétérinaires, du fait de la difficulté de culture ou du prix des kits PCR.

Ensuite, l'utilisation de la rtPCR pour les analyses mycoplasmiques a pu être évaluée dans ces laboratoires, par l'intermédiaire du questionnaire, ce qui a permis de nous positionner en tant qu'animateur par rapport à une éventuelle mutation du réseau VIGIMYC. En effet, les mycoplasmoses chez les petits ruminants semblent être de plus en plus diagnostiquées d'année en année contrairement à celle chez les bovins (données VIGIMYC) (Fig. 8) [87, 89]. Cette différence d'évolution peut donc éventuellement s'expliquer par la méthode d'analyse utilisée par le laboratoire. Aujourd'hui, la méthode de référence en place dans VIGIMYC est la mise en culture puis l'identification de l'espèce de mycoplasme par le MF-dot et c'est elle qui reste la plus utilisée (72 % des laboratoires ont déclaré l'utiliser). Mais cette diminution du nombre d'envoi de souches provenant de bovins pour des identifications de mycoplasmes par VIGIMYC laisse penser à une augmentation de l'utilisation de la rtPCR ou de la PCR pour la détection de *Mb*.

Or, notre étude a montré que la rtPCR et la PCR restent encore peu utilisées par les laboratoires vétérinaires pour les analyses mycoplasmiques. Seulement 20 % des laboratoires déclarent l'utiliser au moins pour les prélèvements de bovins alors que 72 % utilisent la culture uniquement. Cependant, les laboratoires se spécialisent et ce sont ces 20% de laboratoires utilisant la rtPCR ou la PCR à qui sont envoyés la majorité des souches, d'où la diminution d'envoi de souches provenant de bovins à VIGIMYC. D'autres méthodes existent pour traiter les prélèvements issus de bovins : l'étude des critères biochimiques, la PCR, le Pulmotest et la rtPCR, ces deux dernières ne permettant d'identifier que *Mb*. En effet, plusieurs laboratoires participant à VIGIMYC ont déclaré utiliser des méthodes d'analyse autre que la mise

en culture puis l'envoi au réseau pour l'identification : 5 utilisent la rtPCR pour les bovins uniquement (et mettent en culture pour les prélèvements de petits ruminants) et un laboratoire utilise des critères biochimiques pour leur diagnostic. Dans le cas d'une utilisation autre que la mise en culture et l'envoi à VIGIMYC, les résultats ne sont pas pris en compte dans les données d'épidémiosurveillance nationale. Les résultats obtenus à partir de l'étude des critères biochimiques, la PCR, le Pulmotest et la rtPCR échappent à l'épidémiosurveillance réalisée par VIGIMYC, en plus des résultats obtenus par les laboratoires ne participant pas du tout à VIGIMYC (10 de ces laboratoires ont répondu à notre questionnaire). On peut donc penser que les chiffres annoncés par le réseau sont une sous-estimation de la réalité et l'utilisation du kit rtPCR pour les prélèvements de bovins expliquerait donc cette diminution du nombre de cas de mycoplasmoses diagnostiqués dans cette filière.

En ce qui concerne les petits ruminants, un kit de rtPCR a été élaboré récemment, permettant d'identifier *Ma* et trois espèces du groupe « *mycoides* » (*M. mc*, *Mcc* et *Mp*) [11]. Un plus grand nombre d'échantillons peut être traité de façon plus simple et plus rapidement, l'étape de mise en culture étant absente. L'inconvénient majeur est que les trois espèces du groupe « *mycoides* » ne sont pas identifiées individuellement et donc que le traitement antibiotique ne peut être prescrit de façon spécifique et raisonnée et peut donc entraîner des phénomènes d'antibiorésistance. L'un des autres inconvénients est que sans la mise en culture, le clonage ne peut être réalisé ni le typage de la souche. D'un point de vue épidémiologique, la source de contamination ne pourra donc pas être identifiée et il sera impossible de savoir s'il existe une seule souche circulante dans l'élevage ou plusieurs souches différentes.

De plus, l'équipement en thermocycleur ne représente pas un frein à cette utilisation : 93 % des laboratoires possèdent au moins un thermocycleur. En revanche, le faible nombre de demandes d'analyses et le prix des réactifs ou des kits de rtPCR représentent de réels facteurs limitant. On peut donc penser que si la demande d'analyses mycoplasmiques par les vétérinaires n'augmente pas, la mise en culture et l'identification par MF-dot restera encore la technique de référence et celle utilisée par VIGIMYC, bien qu'elle présente plusieurs inconvénients relevés dans certains commentaires faits par les laboratoires tels que la durée de validité courte des milieux ou le délai de réponse, ces contraintes étant absentes avec l'utilisation de la rtPCR. Mais seulement 30 % des laboratoires estiment leur activité diagnostique en augmentation pour les mycoplasmoses des ruminants.

Le questionnaire a mis en évidence une spécialisation des laboratoires par filières et non par équipement technologique, ce dernier ne représentant pas un facteur limitant à l'utilisation de la rtPCR contrairement au volume d'analyse. Les prélèvements sont dorénavant acheminés jusqu'aux laboratoires spécialisés depuis des départements éloignés. Cette démarche est rendue possible grâce au réseau logistique en place en France et permet à chaque laboratoire de faire une économie d'échelle, nécessaire en ce temps de crise économique. Or plusieurs laboratoires, qu'ils adhèrent à VIGIMYC ou pas, n'envoient pas leurs souches à l'Anses, leurs résultats ne sont donc pas pris en compte dans l'épidémiosurveillance. L'animateur

doit faire évoluer le réseau pour que soient pris en considération les données de surveillance issues d'autres systèmes d'analyse, en mettant en place la transmission des résultats au réseau. De plus, le questionnaire a permis de rappeler aux laboratoires vétérinaires le principe du réseau d'épidémiosurveillance VIGIMYC et d'en sensibiliser certains à la problématique des mycoplasmoses des ruminants. Deux laboratoires ont signé la charte de VIGIMYC suite au questionnaire.

La rtPCR présente tout de même de nombreux avantages comme un délai de réponse très rapide, ce qui permet aux vétérinaires d'adapter au mieux le traitement, et un nombre d'échantillons beaucoup plus grand pouvant être analysés en même temps. Ce dernier avantage est surtout intéressant lors de suivi d'élevages atteints de mycoplasmoses comme illustré dans la deuxième partie de ce travail.

Chapitre II : Faisabilité et avantage d'un suivi d'élevage par rtPCR

L'analyse des réponses données par les laboratoires vétérinaires français au questionnaire a mis en évidence le délai de réponse trop long avec la technique de référence, la culture et l'identification par MF-dot. Cette méthode ne semblait donc pas adaptée pour un suivi d'élevage atteint de mycoplasmoses. Nous avons donc étudié la faisabilité d'utiliser la rtPCR pour un tel suivi dans un élevage caprin atteint d'agalactie contagieuse.

I. Objectifs et contexte

I.1. Description générale de l'élevage

I.1.a. Présentation

L'exploitation suivie est une EARL située dans la région Rhône-Alpes. Elle est composée d'un atelier caprin laitier et de surfaces de culture. Le lait est utilisé pour la fabrication de fromages Picodon AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) dans une coopérative laitière. Il n'y a pas d'autres élevages caprins à proximité. En mars 2012, l'exploitation se composait de 251 chèvres de race Saanen en lactation dont 56 chèvres primipares. Elles sont réparties en cinq lots dans un bâtiment bipente fermé (Fig. 18 et 19). Les chevrettes de renouvellement et les chevreaux d'engraissement sont isolés des adultes dans un tunnel (Fig. 20).

Cet élevage est en hors sol mais il comporte un parc d'exercice, exigé dans le cahier des charges Picodon. La nourriture est distribuée à l'intérieur du bâtiment. L'alimentation des adultes se compose de foin et de concentrés. Les chevreaux ne sont pas laissés sous leur mère, ils sont nourris avec du colostrum thermisé (56°C pendant 1h) durant leurs premières 48h puis avec du lait en poudre.

L'aération et la luminosité du bâtiment sont correctes et aucune odeur d'ammoniac n'est détectable. Le bâtiment est très propre et est adapté au nombre d'animaux présents (prévu pour 270 chèvres).

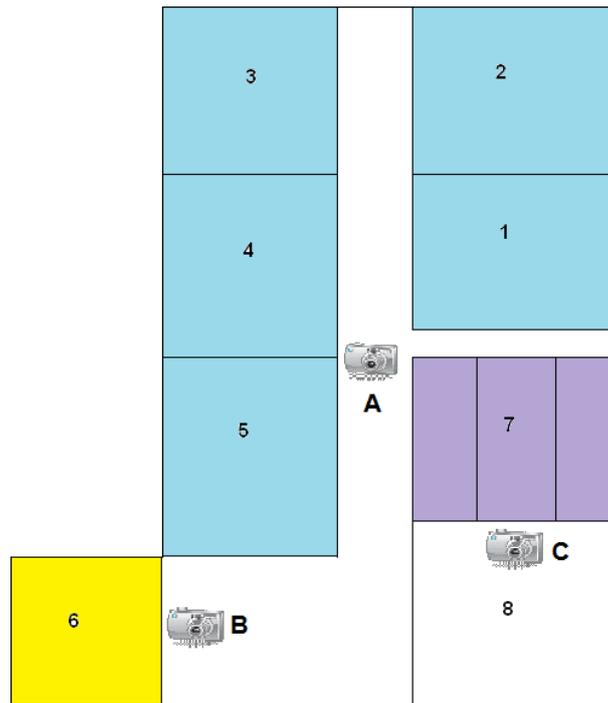


Figure 18. Plan des bâtiments de la chèvrerie.

1, Parc des chèvres primipares (lot 1) ; 2, Parc des chèvres multipares à cellules (lot 2) ; 3, Parc des chèvres en monotraite ou en longue lactation (lot 3), 4, Parc des chèvres multipares sans cellules (lot 4) ; 5, Parc des chèvres multipares sans cellule et des primipares avec plus de 1 000 000 de cellules/mL et de quelques primipares saines ; 6, Parc des chevrettes (nullipares) ; 7, Salle de traite (28 manchons) ; 8, Laiterie ;  : Positions lors de la prise des photographies ; A, Photographie des lots 1 à 4 ; B, Photographie des chevrettes ; C, Photographie de la salle de traite.

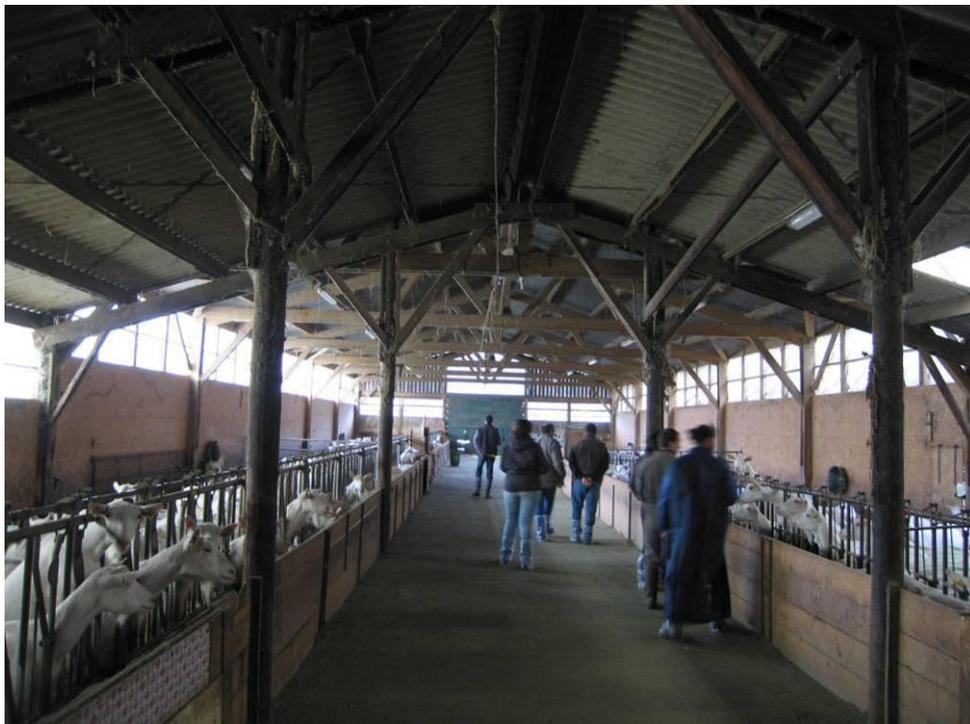


Figure 19. Couloir d'alimentation et lots de chèvres de 1 à 4.
Photographie prise en position A (Fig. 18).



Figure 20. Bâtiment des chevrettes.
Photographie prise en position B (Fig. 18).

I.1.b. Production laitière et technique de traite

Les chèvres de l'exploitation sont de hautes productrices de lait, la production laitière moyenne par animal est de 750 litres par an (soit environ 773 kg en prenant une densité moyenne de 1,031 pour le lait de chèvre) pour les chèvres primipares et de 950 litres (soit environ 979 kg) pour les multipares pour l'année 2011. Ces résultats dépassent largement la moyenne annuelle en Rhône-Alpes de 739 litres (soit 762 kg) pour la campagne 2009-2010 et en France de 861 litres (soit 888 kg) pour la race Saanen pour la campagne 2009-2010) [55]. Après la mise-bas, deux traites par jour sont effectuées et après le pic de lactation, l'éleveur n'effectue qu'une seule traite par jour. La traite dure environ deux minutes, il n'y pas de pré-trempage des trayons et le post-trempage est un spray désinfectant à base d'iode. L'installation de traite est une installation simple équipement parallèle avec des cornadis autobloquants fixes sur deux quais avec 56 places au total, permettant une bonne contention des animaux et une bonne accessibilité aux mamelles. La machine à traire est de la marque DELAVAL et comporte 28 postes en ligne haute et décrochage automatique (Fig. 21).

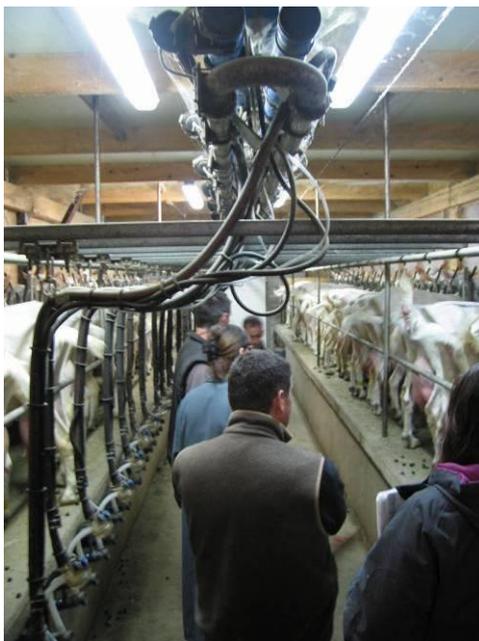


Figure 21. Salle de traite.

Photographie prise en position C (Fig. 18).

I.1.c. Reproduction

L'élevage pratique le dessaisonnement : la période de mise-bas s'étend de fin août à octobre, le tarissement ayant lieu de juin à juillet. Les mises-bas commencent tôt, à l'âge de onze mois voire un an. L'élevage comprend sept boucs adultes et sept jeunes boucs, ces derniers étant en attente d'indexation. L'insémination artificielle est pratiquée sur environ cent cinq chèvres en vue d'amélioration génétique. Le renouvellement se fait en circuit fermé, aucun animal n'est donc introduit dans l'élevage.

I.1.d. Etat sanitaire et prophylaxie

Le troupeau présente peu de problèmes sanitaires. Il y a plusieurs années, l'élevage a rencontré des problèmes d'ecthyma contagieux et d'arthroencéphalopathie virale caprine (CAEV), ce qui a conduit à la suppression du statut indemne au CAEV de l'élevage. Mais ce dernier est redevenu officiellement indemne depuis 2009. En 2010, plusieurs jeunes animaux, âgés de quinze jours à sept mois, ont commencé à présenter des goitres et plusieurs de ces chevreaux sont morts. L'éleveur a alors complété les animaux avec de l'iode, ce qui a nettement amélioré la situation. Toutefois, durant notre visite du 28 mars 2012, plusieurs animaux présentaient encore des goitres (Fig. 22).



Figure 22. Chevrette présentant un goitre lors de notre première visite du 28 mars 2012.

En ce qui concerne la prophylaxie, tous les animaux sont vaccinés contre l'ecthyma contagieux. Les chevrettes sont vaccinées aussi contre la fièvre Q entre trois et quatre mois d'âge. L'éleveur administre un anti-coccidien à base de décoquinatate dans l'aliment et des coproscopies sont réalisées régulièrement et se sont révélées négatives jusqu'à présent, d'où l'absence d'autres traitements antiparasitaires. Pour l'entrée de personnes dans l'élevage, les règles d'hygiène sont strictes. On note la présence d'un pédiluve et l'obligation de porter des surbottes et une blouse propre.

I.1.e. Motif d'appel : séries de mammites

L'éleveur de cette EARL rapporte la vente de chèvres à un autre éleveur en juillet 2011. Ce dernier avait, selon les dires du premier, de gros problèmes de mycoplasmoses dans son élevage. Bien que l'éleveur en visite n'ait pas été en contact direct avec les chèvres et qu'il soit resté dans le couloir d'alimentation, il est rentré dans l'élevage sans protection vestimentaire. Après cette visite, l'éleveur de l'EARL a désinfecté le bâtiment.

Depuis le début des mises-bas en septembre 2011, l'éleveur a remarqué une augmentation du comptage de cellules somatiques (CCS) sur lait individuel passant de moins de 100 000 cellules par millilitre de lait à 800 000 cellules par millilitre de lait en moyenne, allant jusqu'à 1 600 000 cellules. A partir de janvier 2012, les premiers signes de mammites sont apparus sur quinze chèvres. Des analyses sur le lait, réalisées au laboratoire de Pathologie du Bétail de VetAgro Sup, ont à ce moment-là révélé la présence d'un mycoplasme appartenant au groupe « *mycoides* » (*Mcc*, identifié le 16 février 2012), agent reconnu d'agalactie contagieuse. Cette souche a été identifiée via le réseau VIGIMYC et mise en collection à l'Anses sous le numéro 15751.

Les animaux sont atteints de mammites bilatérales accompagnées ou non d'arthrites. Le lait a un aspect de « purée liquide », il présente des grumeaux, est de couleur verdâtre et est malodorant.

I.2. Visites réalisées, observations et recommandations

L'éleveur et le vétérinaire traitant, le Docteur Pierre Devillechaise, ont demandé à l'UMR Mycoplasmoses des ruminants, en la personne du Docteur Dominique Le Grand, un suivi d'élevage, suite à des problèmes de mammites cliniques, de baisse de production laitière et d'augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait. Ces problèmes étaient apparus dès le début des mises bas en septembre 2011.

I.2.a. Observations des animaux

Accompagnée du docteur Pierre Devillechaise (vétérinaire spécialisé dans les caprins), de Camille Quicard (conseillère à la coopérative), du docteur Dominique Le Grand (enseignante-chercheur à VetAgro Sup Campus Vétérinaire) et du docteur Philippe Terranova (interne en pathologie du bétail à VetAgro Sup), nous avons effectué trois visites de l'élevage (28 mars, 18 mai et 29 novembre 2012), le suivi de l'élevage s'est fait sur 9 mois.

Lors de notre première visite du 28 mars 2012, vingt chèvres à mammites avaient été observées par l'éleveur parmi les primipares (lots 1 et 3), et une parmi les bipares (lot 3) :

- Quatre avaient été euthanasiées dont deux en raison d'arthrite sévère ;
- Une avait été emmenée à l'abattoir ;
- Cinq avaient rechuté au moins une fois après le traitement (n°0964, 1017, 1029, 1041, 1071) ;
- Sept ne présentaient plus de symptômes et n'avaient pas rechuté après le traitement (n°1012, 1021, 1022, 1038, 1045, 1048 et 1055) ;
- Trois présentaient toujours des signes cliniques après le traitement (n°1010, 1058, 1109).

Lors de notre deuxième visite du 18 Mai 2012, il n'y avait eu qu'une seule chèvre avec le quartier droit mammitieux (n°1045, chèvre ayant déjà eu un traitement auparavant) et deux chèvres avaient été suspectées pour de l'arthrite (n°1028 et 1085).

Lors de notre troisième visite du 29 novembre 2012, deux chèvres avaient fait une rechute après mise-bas et sont mortes (11021 et 11041), aucune autre chèvre ne présentait des signes cliniques.

I.2.b. Impacts sur la production laitière et le comptage des cellules somatiques

L'augmentation du CCS a une influence non négligeable pour la transformation du lait de chèvre, notamment au moment de l'égouttage, dont le temps se trouve augmenté, et l'odeur et la saveur sont aussi modifiées [10]. Ceci explique la prise en compte du CCS pour le paiement du lait. Pour le lait collecté, il doit être inférieur à :

- $1,5 \cdot 10^6$ /mL, si le lait est destiné à subir un traitement thermique ;
- $5 \cdot 10^5$ /mL, si le lait est destiné à être utilisé cru (cas du fromage Picodon) [82].

Une augmentation générale du CCS a été observée dans cet élevage à partir de septembre 2011 (données du contrôle laitier). De plus, en février, la production laitière de douze chèvres, parmi les quinze ayant eu une mammite, a diminué de 0,1kg par jour jusqu'à 2,3kg par jour par rapport au contrôle précédent. (Tab. III).

Tableau III. Taux cellulaires et variations de production laitière à trois contrôles laitiers des quinze chèvres ayant présenté des mammites avant notre première visite du 28 mars 2012.

Nom ANIMAL	CCS (x1000) /ml			Var Lait (en kg)		
	CL 23/12/11	CL 02/02/12	CL 13/03/12	Δ CL 23/12/11	Δ CL 02/02/12	Δ CL 13/03/12
964	644	NC	6117	1,2	NC	NC
1009	34	80	131	0,6	-0,7	0,6
1010	91	113	9999	0,7	-0,8	0,3
1012	49	280	8285	0,5	-0,1	0
1017	65	182	7687	0,3	0,6	-2,2
1021	3644	3518	9999	0,8	-0,5	-0,4
1022	1508	658	9999	0,5	0,6	-2,1
1029	129	443	866	-0,1	-0,7	1,2
1038	6845	1105	NC	0,3	-0,7	NC
1041	264	393	9999	0,5	-0,4	-1,3
1045	81	391	9999	0,7	-0,7	0
1048	41	177	1289	0,1	-0,5	0,4
1055	171	244	9999	0,3	-0,2	-0,1
1058	554	478	653	0,2	-0,6	0,7
1071	94	9999	9999	0,2	-2,3	0,9

Nom de l'animal, numéro de travail de l'animal correspondant aux quatre derniers chiffres de son numéro national ; CL, Contrôle Laitier ; CCS, comptage des cellules somatiques ; Δ CL, différence entre le dernier et l'avant-dernier Contrôle Laitier ; Var Lait, variation de la quantité de lait produite par chaque chèvre entre deux contrôles consécutifs.

D'après le contrôle laitier du 13 mars 2012, sur les quinze chèvres à mammite, une seule a moins de $5 \cdot 10^5$ cellules/mL et dix d'entre elles ont plus de $1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Ceci a entraîné l'élimination de soixante litres par jour pendant vingt jours, correspondant à la production des chèvres présentant des signes cliniques ou en cours de traitements antibiotiques. L'éleveur a donc perdu 700€ (0,583€/L) en vingt jours (Annexe 9).

I.2.c. Mesures sanitaires et médicales mises en place avant la deuxième visite

En ce qui concerne les mesures sanitaires, la litière a été curée et le bâtiment désinfecté ce qui a diminué le nombre de nouveaux cas. Quinze jours après les premières mammites, les chevrettes ont été traitées les dernières.

Plusieurs essais thérapeutiques avaient été entrepris avant notre venue avec pour certaines chèvres une amélioration clinique mais aucune amélioration au niveau de la production laitière et du taux de cellules somatiques dans le lait :

- Un traitement au Tylan[®] (tylosine), à la dose de 10mg de tylosine par kg de poids vif, voie intramusculaire, pendant 10 jours uniquement ;
- Un traitement au Tylan[®], à la dose de 10mg de tylosine par kg de poids vif, voie intramusculaire, pendant 10 jours suivi d'un deuxième identique en cas de rechute ;
- Un traitement au Tylan[®], à la dose de 10mg de tylosine par kg de poids vif, voie intramusculaire, pendant 10 jours avec de la Lincocine[®] intramammaire (lincomycine), trois applicateurs par quartier infecté à 12h d'intervalle, les chèvres ont fait autant de rechutes qu'avec seulement du Tylan[®] mais les symptômes ont disparu plus rapidement d'après l'éleveur.

I.2.d. Prélèvements effectués

Les prélèvements effectués ont permis d'étudier l'évolution des résultats des différentes chèvres « malades », « guéries » et « saines ».

Durant notre première visite (28 mars 2012), nous avons commencé les prélèvements avec les écouvillons auriculaires sur toutes les chèvres dites « malades » (ayant toujours des signes cliniques) et celles dites « guéries » (n'ayant plus de signes cliniques) ainsi que certaines dites « saines » (n'ayant eu aucun signe clinique). Le but de ces prélèvements auriculaires était d'appréhender le portage auriculaire asymptomatique et de comparer les espèces présentes dans le lait et dans les oreilles, pouvant expliquer une possible transmission entre les chèvres par la voie auriculaire.

Durant notre deuxième visite (18 mai 2012), nous avons prélevé des échantillons de lait de toutes les chèvres comprises dans les lots 1 et 3, comprenant toutes les chèvres « malades » ou « guéries », ainsi que les écouvillons auriculaires de chèvres « saines ».

Durant notre troisième visite (29 novembre 2012), nous avons prélevé un échantillon de lait de toutes les chèvres des lots 3 et 4 comprenant certaines des précédentes chèvres prélevées ainsi que du lait des chèvres des lots 2 et 5 comprenant le reste des chèvres prélevées précédemment.

II. Matériel et méthodes

II.1. Prélèvements

Pour mener notre étude, deux types de prélèvements ont été effectués dans les lots 1 et 3, lots des chèvres ayant eu des mammites :

- des écouvillons auriculaires, un par oreille et par chèvre, certains effectués lors de notre première visite du 28 mars 2012 (15 chèvres dites « malades » ou « guéries » et 2 dites « sains » des lots 1 et 3), les autres lors de notre seconde visite du 18 mai 2012 (29 chèvres « saines »). Quarante-six écouvillons ont été prélevés. Ils ont été conservés en milieu sec à -80°C ;

- un échantillon de lait par chèvre, composé d'un mélange des mamelles droite et gauche. Nous avons prélevé les laits de toutes les chèvres lors de notre seconde visite pendant la traite du matin, 109 laits au total ont été prélevés. Lors de notre troisième visite, 127 laits ont été prélevés (comprenant celui des chèvres dans les lots 1 et 3 de départ et d'autres chèvres mélangées avec elle depuis notre deuxième visite). Les laits ont été conservés à -80°C.

II.2. Analyses en laboratoire

Les mêmes types d'analyses ont été réalisés sur les échantillons de lait et sur les écouvillons auriculaires (Fig. 22). Ce système nous a permis de comparer la concordance des résultats obtenus à partir des techniques de MF-dot et rtPCR. De plus, la culture suivie du MF-dot nous a permis le cas échéant de récupérer des isolats cliniques.

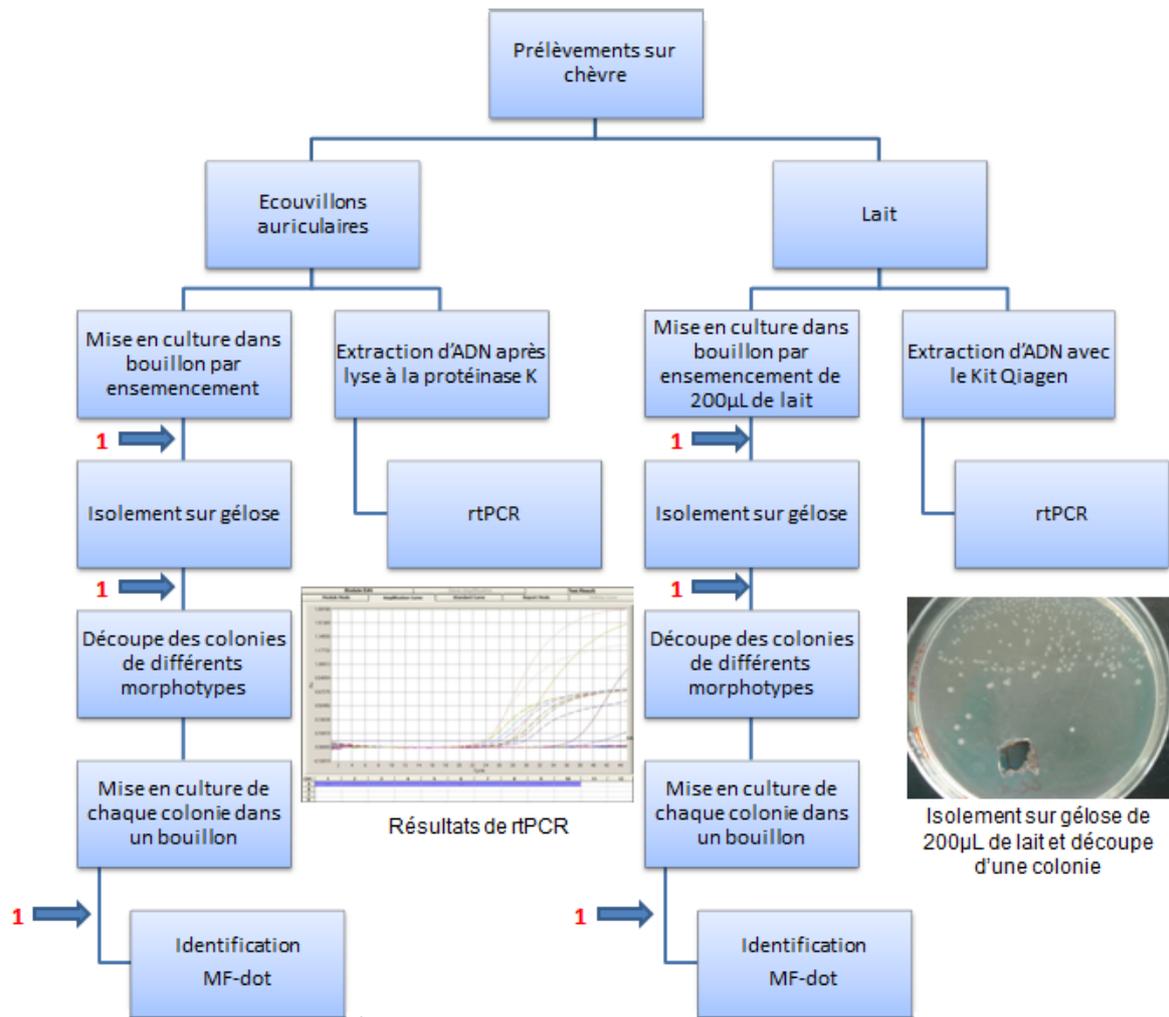


Figure 23. Différentes manipulations réalisées sur les prélèvements.
 1, incubation 24h à 37°C et 5% de dioxyde de carbone (CO₂).

II.2.a. Culture et identification par MF-dot

Les écouvillons auriculaires ont tout d'abord été mis en culture dans un bouillon (milieu spécifique aux mycoplasmes comme exposé dans la partie I), en introduisant l'écouvillon dans le bouillon et en l'agitant à l'intérieur (l'écouvillon était ensuite placé dans le tampon de lyse pour l'extraction d'ADN développée en II.2.b). On a utilisé le même milieu pour ensemencer 200µL de lait. Le tout a été vortexé et mis en incubation à l'étuve 24h à 37°C et 5% de CO₂.

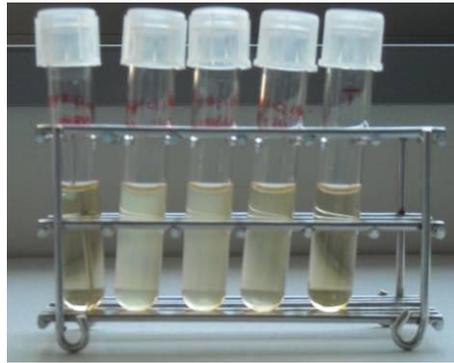


Figure 24. Tubes ensemencés à l'aide d'écouvillons auriculaires ou avec 200 μ L de lait. Le dernier tube à droite est le témoin négatif. Seul le premier tube a la même turbidité que le témoin négatif, on peut donc suspecter la présence de mycoplasmes dans les trois autres tube.

En cas de trouble du milieu (Fig. 24), 10 μ L ont été prélevés à l'aide d'une öse et étalés sur une gélose solide afin d'isoler les colonies. Après croissance, un morceau de gélose contenant une colonie est découpé (Fig. 25) pour être mis en culture dans un bouillon et mis en incubation à l'étuve 24h à 37°C et 5% de CO₂. Si plusieurs morphotypes de mycoplasmes étaient visibles sur la boîte, l'isolement individuel de chaque morphotype a été réalisé.

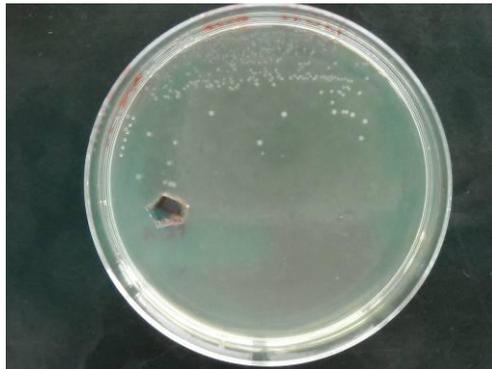


Figure 25. Gélose sur laquelle ont été isolées les colonies de mycoplasmes contenues dans le lait de la chèvre n°11012.

Pour chaque morphotype de colonie, l'identification de l'espèce s'est faite ensuite à l'aide de la technique de MF-dot [84]. Les espèces recherchées étaient les quatre agents étiologiques de l'agalactie contagieuse : *Ma*, *Mmc*, *Mcc* et *Mp* (Fig. 26).

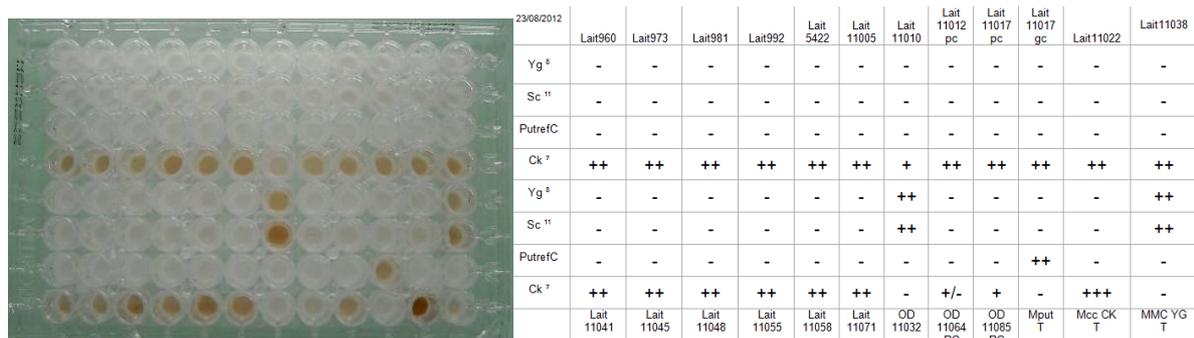


Figure 26. Plaque du MF-dot réalisé le 23 août 2012 (à gauche) et tableau du plan de cette même plaque (à droite).

Lait [...], culture provenant du lait de la chèvre n° [...]; OD [...], culture provenant de l'écouvillon auriculaire droit de la chèvre n° [...]; Yg⁸, anticorps anti-Mmc Y Goat n°8 ; Sc¹¹, antisérum polyclonal anti-*M. mycoides subsp. mycoides* (anciennement biotype Small Colony), il est non spécifique et réagit aussi bien avec les souches des sous-espèces *M. mycoides subsp. mycoides* et *Mmc* ; PutrefC, anticorps anti-Mput ; Ck⁷, anticorps anti-Mcc California Kid ; Mput T, souche de *Mp* (témoin positif) ; Mcc CK T, souche de *Mcc CK* (témoin positif) ; MMC YG T, souche de *Mmc* (témoin positif).

II.2.b. Extraction d'ADN et analyse par rtPCR

Les écouvillons auriculaires et les laits n'ont pas été traités de la même manière pour extraire l'ADN mycoplasmique. Pour les écouvillons auriculaires, nous avons utilisé le même protocole utilisé pour le traitement des écouvillons collectés sur faune sauvage [111]. Celui-ci repose sur une lyse grossière à l'aide de la protéinase K, permettant de libérer l'ADN récolté sur l'écouvillon, qui est introduit dans 0,5mL du tampon de lyse [64]. Nous avons tout d'abord extrait l'ADN des écouvillons de l'oreille droite, puis dans un deuxième temps celui de l'oreille gauche pour quelques chèvres. Pour les laits, l'ADN était extrait à partir de 200µL de lait, à l'aide du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen). Pour limiter le nombre d'analyses, nous avons tout d'abord analysé des mélanges de laits de quatre chèvres.

L'ADN extrait à l'aide de ces protocoles a été ensuite traité de la même manière, par rtPCR, à l'aide du kit TaqVet[™] Contagious Agalactia Screening, développé en interne [11]. Cette technique permet de détecter *Ma* et le groupe « *mycoides* », sans distinguer *Mmc*, *Mcc* et *Mput*. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel pilote de l'appareil de rtPCR. On considérait que l'échantillon était positif lorsque le Ct était strictement inférieur à 39,5. Pour les mélanges de laits, si le résultat de la rtPCR était négatif, cela signifiait que les quatre laits étaient exempts de *Ma* et de mycoplasmes du groupe « *mycoides* ». En revanche, lorsque le résultat ressortait positif, nous avons, pour certains des mélanges, extrait l'ADN de chaque lait puis nous l'avons analysé individuellement par rtPCR pour déterminer le ou lesquels étaient vraiment positifs.

II.2.c. Typage des souches par Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA)

Après avoir identifié les souches présentes dans l'élevage, nous avons étudié le polymorphisme génétique des souches d'une même espèce à l'aide d'une analyse des microsatellites (Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)), développée dans l'UMR Mycoplasmoses des ruminants de l'Anses [13,48]. Seul un locus a été retenu, du fait de sa grande variabilité pour des souches tout venant, pour analyser les souches de l'élevage suivi (Annexe 11).

III. Résultats

III.1. **Caractéristiques générales de l'échantillon étudié**

Lors de nos deux premières visites, nous avons prélevé le lait et les écouvillons auriculaires de 109 chèvres : 92 chèvres « saines » et 17 chèvres « malades ». Sur ces 109 chèvres, nous avons sélectionnés les chèvres « malades », « guéries », celles avec un taux cellulaire augmenté (supérieur à 500 000 cellules/mL) et des « saines » des lots atteints et nous avons donc analysés :

- 52 écouvillons auriculaires et 98 laits par rtPCR ;
- 28 écouvillons d'oreille droite et 28 laits mis en culture (positifs à la rtPCR) puis l'identification a été faite par MF-dot.

Les résultats individuels sont donnés dans l'annexe 10.

Aucun prélèvement n'est revenu positif à *Ma* pour le lait et les écouvillons auriculaires, aussi bien par rtPCR que par MF-dot. Parmi les 98 laits et les 52 écouvillons auriculaires analysés par rtPCR, respectivement 35 (36%) et 39 (75%) se sont révélés positifs pour le groupe « *mycoïdes* ». Mais en se basant uniquement sur les résultats obtenus par rtPCR, nous ne savions pas si les souches présentes dans les oreilles et les laits étaient les mêmes et quelle(s) espèce(s) étaient en cause. Nous avons donc mis en culture certains de ces échantillons et, en cas de culture, nous les avons analysés par MF-dot (Tab 4).

Parmi les 35 laits positifs en rtPCR, 17 laits ont été mis en culture : 4 n'ont pu être analysés par MF-dot du fait de l'absence de croissance bactérienne en culture (les 4 avaient un Ct supérieur à 35 en rtPCR), les 13 autres se sont révélés positifs à *Mcc* (tous avaient un Ct inférieur à 35 en rtPCR). Parmi les 63 laits négatifs en rtPCR (Ct supérieur ou égal à 39,5), 11 laits ont été cultivés : 7 n'ont pas pu être analysés par MF-dot du fait de l'absence de croissance bactérienne en culture (les 7 avaient un Ct supérieur à 35 en rtPCR), les 4 autres se sont révélés positifs à *Mcc*. Parmi ces 4 derniers laits, 3 ont été analysés dans 3 pools de 4 laits, ceci laisse penser qu'une dilution des mycoplasmes s'est faite avec le mélange des autres laits, que l'échantillon a été mal homogénéisé ou que l'extraction d'ADN sur la colonne a échoué suite au colmatage de celle-ci par les protéines du lait (biais de

manipulation). Le quatrième a été traité seul mais la mauvaise homogénéisation ou un problème lors de l'extraction peuvent aussi expliquer ce résultat (faux négatif). (Tab. IV)

Tableau IV. Concordance des résultats obtenus sur les laits en fonction de la technique employée, rtPCR ou culture et identification par MF-dot.

Laits			Culture et identification par MF-dot		
rtPCR	Négative	63	Négative	7	Total = 11
			Positive	4 Mcc ^a	
	Positive	35	Négative	4 ^b	Total = 17
			Positive	13 Mcc	

RtPCR positive, Ct inférieur à 39,5 ; rtPCR négative, Ct supérieur ou égal à 39,5 ; culture et identification par MF-dot positive, identification de la souche par MF-dot ; culture et identification par MF-dot négative, pas de culture ; a, laits avec un Ct supérieur à 39,5 et un MF-dot positif comprenant 3 laits analysés dans des pools de 4 laits (possible dilution) et 1 analysé seul (mauvaise homogénéisation ou problème lors de l'extraction d'ADN) ; b, laits avec un Ct inférieur à 39,5 en rtPCR et une culture négative (mauvaise conservation ou mauvaise homogénéisation de l'échantillon).

Parmi les 13 écouvillons auriculaires négatifs en rtPCR (Ct supérieur ou égal à 39,5), 7 écouvillons ont été cultivés et aucun n'a pu être analysé par MF-dot du fait de l'absence de culture (les 7 avaient un Ct supérieur à 35 en rtPCR) (Tab. V).

Parmi les 39 écouvillons auriculaires positifs en rtPCR, 28 écouvillons ont été mis en culture : 18 n'ont pu être analysés par MF-dot du fait de l'absence de culture (seulement 4 avaient un Ct supérieur à 35 en rtPCR), 7 se sont révélés positifs à *Mmc*, 2 se sont révélés positifs à *Mcc* et 1 s'est révélé positif à *Mmc* et *Mcc* (tous avaient un Ct inférieur à 35 en rtPCR). Sur les 18 écouvillons dont la culture était négative, au moins 14 (ceux dont le Ct était inférieur à 35 en rtPCR) sont très probablement des faux négatifs. Ce biais est dû à une mauvaise conservation de mycoplasmes viables sur écouvillon sec à -80°C ou bien à une mauvaise homogénéisation du bouillon après ensemencement à partir de l'écouvillon (Tab. V).

Tableau V. Concordance des résultats obtenus sur les écouvillons auriculaires en fonction de la technique employée, rtPCR ou culture et identification par MF-dot.

Ecouvillons auriculaires			Culture et identification par MF-dot		
rtPCR	Négative	13	Négative	7	Total = 7
			Positive	0	
	Positive	39	Négative	18 ^a	Total = 28
			Positive	7 <i>Mmc</i> , 2 <i>Mcc</i> , 1 <i>Mmc+Mcc</i>	

RtPCR positive, Ct inférieur à 39,5 ; rtPCR négative, Ct supérieur ou égal à 39,5 ; culture et identification par MF-dot positive, identification de la souche par MF-dot ; culture et identification par MF-dot négative, pas de culture ; a, 14 écouvillons auriculaires dont le Ct est supérieur à 39,5 (peu de mycoplasme) et 4 analysés seuls (mauvaise conservation ou mauvaise homogénéisation du prélèvement).

En théorie, la rtPCR permet de quantifier le niveau d'excrétion avec le Ct. D'après nos résultats, on peut considérer l'excrétion comme suffisante pour

permettre l'isolement de la souche par culture dès lors que le Ct est inférieur à 35. En revanche, la culture semble très compromise dès lors que le Ct est supérieur à 35.

En ce qui concerne l'identification de souches réalisées par MF-dot, 7 écouvillons auriculaires se sont révélés positifs pour *Mmc*, 2 pour *Mmc* et *Mcc* et 1 pour *Mcc* uniquement (Tab. V) et les 17 laits se sont révélés positifs pour *Mcc* uniquement (Tab. IV). *Mmc* est donc l'espèce prédominante dans les oreilles alors que seul *Mcc* est identifié dans le lait.

III.2. Interprétation des résultats : définition du statut sanitaire du troupeau en fonction des analyses

Dans cette partie, seuls les résultats obtenus par rtPCR ont été analysés. Le MF-dot n'a été ensuite qu'utilisé pour l'identification des cultures positives.

III.2.a. Lait/Clinique

En se basant uniquement sur les signes cliniques, sur les 81 laits des chèvres « saines » analysés par rtPCR, 60 (74%) sont revenus négatifs pour le groupe « *mycoïdes* » et 21 (26%) positifs. Pour les 17 laits de chèvres « malades », 3 (18%) sont revenus négatifs et 14 (82%) sont revenus positifs. Parmi les 35 laits positifs en rtPCR, 13 sont revenus positifs pour *Mcc* et 4 sont revenus négatifs après repiquage de la colonie dans un bouillon, les 18 autres n'ont pas été analysés (Tab. IV).

Ces différences entre la clinique et la présence ou non de mycoplasme dans le lait peuvent s'expliquer par l'excrétion intermittente des mycoplasmes dans le lait [7] et par un biais de méthode suite à une mauvaise homogénéisation de l'échantillon et donc l'absence de mycoplasme dans ce qui a été prélevé du tube (que ce soit avec l'öse pour la culture ou la pipette automatique pour la rtPCR).

Si l'on regarde les CCS, d'après le contrôle laitier du 13 mars 2012, parmi les 34 laits positifs en rtPCR, 15 ont plus de 500 000 cellules/mL et 19 moins de 500 000 cellules/mL. Ces 19 derniers laits étaient donc issus d'animaux porteurs sains ou bien la rtPCR a seulement détecté des débris de mycoplasmes. Parmi les 61 laits négatifs en rtPCR, 38 ont moins de 500 000 cellules/mL et 23 ont en plus de 500 000. On peut supposer que ces 23 chèvres débutaient une mammite et que la quantité en mycoplasmes dans le prélèvement était trop faible pour une détection par rtPCR, qu'il y a eu un biais de manipulation (mauvaise homogénéisation de l'échantillon), ou bien qu'à cause de l'intermittence d'excrétion de mycoplasmes dans le lait il n'y en avait pas dans le lait au moment du prélèvement [7] (Tab. VI).

Tableau VI. Résultats obtenus en rtPCR et comptage des cellules somatiques au contrôle laitier du 13 mars 2012.

		CCS	
		>500 000	<500 000
rtPCR	Positive	15	19
	Négative	23	38

RtPCR positive, Ct inférieur à 39,5 ; rtPCR négative, Ct supérieur ou égal à 39,5 ; >500 000, CCS supérieur à 500 000 cellules/mL ; <500 000, CCS inférieur à 500 000 cellules/mL.

III.2.b. Lait/Traitement antibiotique

Comme dit précédemment, l'éleveur a effectué trois types de traitements antibiotiques dès lors que les mammites ont commencé. Nous avons étudié les résultats de rtPCR et MF-dot sur le lait des 15 chèvres malades, suites aux différents traitements antibiotiques :

- Un traitement au Tylan[®] pendant 10 jours sur 3 primipares : les 3 chèvres se sont révélées positives en rtPCR dont 2 positives à *Mcc* et 1 non testée au MF-dot.

- Deux traitements au Tylan[®] pendant 10 jours sur une bipare et quatre primipares (les cinq avec rechutes) : 4 chèvres positives et 1 négative en rtPCR dont 3 positives à *Mcc*, 1 négative (la même que celle en rtPCR) et 1 non testée en MF-dot.

- Un traitement au Tylan[®] pendant 10 jours et de la Lincocyne[®] en intramammaire sur 7 primipares : 6 positives et 1 négatives en rtPCR dont 6 positives à *Mcc* (5 identiques à celles en rtPCR) et 1 non testée en MF-dot. Selon l'éleveur, ce traitement permettait une disparition des symptômes plus rapidement mais les rechutes restaient constantes.

La majorité des chèvres (13/15) sont restées porteuses de mycoplasmes après les différents traitements entrepris par l'éleveur. Ceci confirme le Chapitre I, la guérison bactériologique reste illusoire pour les mycoplasmes.

III.2.c. Oreille/Clinique

Sur les 28 écouvillons auriculaires droit des chèvres « saines » analysés par rtPCR, 4 sont revenus négatifs au groupe « *mycoides* » et 24 sont revenus positifs, dont 7 identifiés comme *Mmc* et 2 comme *Mcc* par MF-dot. Sur les 17 écouvillons auriculaires droit des chèvres « malades » analysés par rtPCR, 6 sont revenus négatifs et 11 sont revenus positifs, dont un positif à *Mcc* et *Mmc* par MF-dot. Sur les 7 écouvillons auriculaires gauche des chèvres « malades » analysés par rtPCR, 3 sont revenus négatifs et 4 sont revenus positifs. Si l'on compare les résultats entre les deux oreilles d'une même chèvre, on peut voir que sur les 7 chèvres « malades » sur lesquelles les deux oreilles ont été analysées par rtPCR, 5 chèvres ont le même résultat pour les deux oreilles (3 positives et 2 négatives) et les 2 autres chèvres n'ont pas le même résultat pour les deux oreilles.

Le portage auriculaire ne présente donc aucun lien avec la clinique mammaire.

III.2.d. Oreille/Lait

En comparant en fonction des techniques, sur 21 chèvres dont le lait était positif au groupe « *mycoides* » en rtPCR, 2 chèvres avaient les 2 écouvillons positifs, 12 avaient un écouvillon positif, 2 avec un écouvillon positif et l'autre négatif, 4 avaient un écouvillon négatif et un avait les 2 écouvillons négatifs. Sur 24 chèvres

dont le lait s'est révélé négatif en rtPCR, 1 avait les 2 écouvillons positifs, 19 avaient 1 écouvillon positif, 3 avaient 1 écouvillon négatif et 1 avait les 2 écouvillons négatifs.

En ce qui concerne les espèces mycoplasmaïques présentes dans le lait et les oreilles, sur 8 chèvres dont le lait était exempt de mycoplasmes, 4 l'étaient aussi dans une des deux oreilles, 2 avaient un écouvillon auriculaire positif pour *Mmc* et les 2 dernières pour *Mcc*. Sur 12 chèvres dont le lait était positif pour *Mcc*, aucune n'était porteuse dans les oreilles (ni à droite ni à gauche). Si l'on considère que les résultats au MF-dot ici, ce résultat est probablement dû à la mauvaise conservation des mycoplasmes sur les écouvillons secs à -80°C.

D'après les résultats des deux méthodes, il est difficile de conclure à un lien entre le portage auriculaire de mycoplasmes et leur transmission dans la mamelle, *Mmc* étant l'espèce prédominante dans les oreilles alors que seul *Mcc* a été identifié dans le lait. Les écouvillons auriculaires ne semblent donc pas adaptés pour un suivi d'élevage atteint d'agalactie contagieuse, seul le lait reste le prélèvement de choix, bien que la technique de prélèvement soit plus fastidieuse.

III.2.e. Lait/Traitement au tarissement

Lors de notre troisième visite (29 novembre 2012), les primipares et les multipares avaient commencé à mettre bas. Les lots avaient été réorganisés (la majorité des 109 chèvres se trouvaient dans les lots 3 et 4), 26 des 109 chèvres ont été réformées, 3 sont mortes (dont 2 avaient été traitées au Spéciorlac[®] et au Tylan[®]) et 1 était tarie. Aucune autre chèvre n'a présenté de signes de mammites entre notre deuxième visite et notre troisième visite.

Le lait de 65 chèvres a été analysé par rtPCR afin de suivre l'évolution de la maladie au sein de l'élevage et d'évaluer l'efficacité des différents traitements au tarissement utilisés par l'éleveur :

- quinze de ces 65 laits provenaient de chèvres qui n'avaient pas été prélevées lors de nos deux premières visites (mais mélangées cette fois-ci avec les 109 chèvres de départ), celles-ci se sont révélées toutes négatives en rtPCR, aucune de ces chèvres avaient été traitées au tarissement ;
- les laits de 16 chèvres sont restés négatifs (négatifs avant la mise-bas), dont 2 chèvres avaient été traitées avec du Spéciorlac[®] (spiramycine et néomycine) et du Tylan[®] et 1 avec du Nafpenzal[®] (benzylpénicilline, nafcilline, dihydrostreptomycine) ;
- les laits de 20 chèvres sont devenus négatifs (positifs avant la mise-bas), dont 5 chèvres avaient été traitées avec du Spéciorlac[®] et du Tylan[®] ;
- les laits de 4 chèvres sont devenus positifs (négatifs avant la mise-bas), dont aucune chèvre n'avait été traitée ;
- les laits de 10 sont restés positifs (positifs avant la mise-bas), dont 7 chèvres avaient traitées avec du Spéciorlac[®] et du Tylan[®] .

Sur 30 chèvres dont le lait était positif avant la mise-bas, 20 (67%) avaient un lait négatif après la mise-bas, avec ou sans traitement. Ceci a fait un total de 51 (78%) chèvres dont le résultat du lait analysé par rtPCR était négatif et de 14 (22%)

chèvres dont le résultat était positif, pour cette deuxième analyse du troupeau. On a donc noté une diminution du pourcentage de chèvres positives au groupe « *mycoides* » dans le lait par rapport aux résultats avant la mise bas (36% des chèvres avaient un résultat positif en rtPCR sur lait). Ceci s'expliquait en grande partie par les 26 chèvres réformées et non par les traitements au tarissement, dont l'efficacité reste aléatoire en fonction des individus.

III.3. Circulation des souches dans le troupeau

L'identification par la méthode MF-dot des souches isolées des laits prélevés a permis de conclure qu'il s'agissait toujours de l'espèce *Mcc*, qui était responsable des mammites dans l'élevage suivi, depuis la première identification le 16 février 2012. Il était donc intéressant d'étudier la clonalité entre les souches de *Mcc* présentes dans l'élevage. Nous l'avons aussi comparée avec des souches tout venant. D'après la figure 28, les 17 souches de *Mcc* provenant de 17 laits ont migré exactement au même niveau à l'exception de la souche extraite du lait L5422. Deux bandes sont visibles, l'une au même niveau que toutes les autres souches de l'élevage suivi et une autre au même niveau qu'une souche ne provenant pas de l'élevage (14670). Du fait de son unicité et de la découpe d'une seule colonie par morphotype au départ, on peut en conclure qu'il s'agit probablement d'une contamination.

La clonalité des souches de *Mcc* a été étudiée aussi entre les souches provenant de lait et celles provenant des écouvillons auriculaires (Fig. 28). La souche isolée des oreilles n'est pas la même que celle des laits, mais elle est identique entre les deux individus.

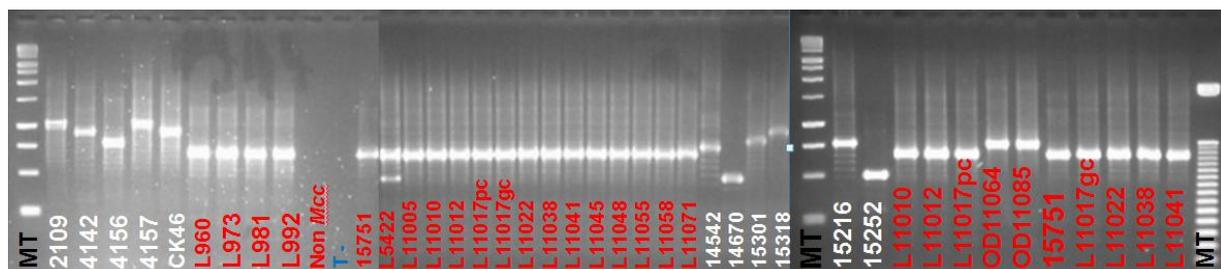


Figure 27. Typage des souches par MLVA.

«2109, 4142, 4156, 4157, CK46» (souche California Kid 46), « 14542, 14670, 15301, 15318, 15216, 15252 », souches tout venant d'animaux avec des commémoratifs variables pour estimer la sensibilité du VNTR ; L[...], ADN mycoplasmaïque extrait du lait de la chèvre de l'élevage suivi dont le numéro de travail était [...]; OD[...], ADN mycoplasmaïque extrait de l'oreille droite de la chèvre de l'élevage suivi dont le numéro de travail était [...]; 15751, ADN de la première souche de *Mcc* repérée par VIGIMYC dans l'élevage suivi le 16 février 2012 (témoin positif) ; T-, eau (témoin négatif) ; MT, marqueur de taille ; Non *Mcc*, souche ADN issue de l'élevage suivi identifiée comme *Mcc* au MF-dot (faux positif) ; L11017pc et L11017gc, lait de la chèvre 11017 dont la culture a donné 2 morphotypes différents, respectivement des petites colonies et des grandes colonies. Du fait d'un morphotype différent, les deux souches ont été analysées pour vérifier leur clonalité. La taille attendue était de 843 bp modulo 42.

Le VNTR 1 s'est donc révélé très stable pour les isolats provenant de lait des chèvres de l'élevage suivi, confirmant leur clonalité, y compris par rapport à la

première souche repérée par VIGIMYC dans cet élevage (appelée « 15751 »). En revanche, les souches de *Mcc* isolées dans les écouvillons auriculaires, identiques entre elles, variaient avec celles isolées dans le lait.

IV. Discussion

IV.1. Analyse permise par le sous-typage :

IV.1.a. Sous-espèce (MF-dot)

La détection des animaux porteurs de mycoplasmes (qu'ils soient symptomatiques ou asymptomatiques) a été faite par rtPCR. Mais les informations données par cette technique étaient insuffisantes car nous ne connaissions pas quelle(s) espèce(s) étaient en cause ni si elles étaient identiques dans les oreilles et la mamelle. Des analyses plus fines ont donc été réalisées sur ces animaux, tels que l'identification des espèces en cause et leur sous-typage. La technique du MF-dot a permis d'identifier l'espèce mycoplasémique, *Mcc*, responsable de l'augmentation des taux cellulaires dans le lait accompagnée ensuite de mammites cliniques sur les chèvres. L'un des principaux intérêts de cette information par rapport à la rtPCR étaient d'étudier le possible lien entre le portage auriculaire de mycoplasmes et une possible transmission mammaire, d'identifier les espèces en cause pour un traitement antibiotique raisonné et d'étudier la clonalité des souches de l'élevage suivi. La transmission auriculaire-mammaire n'était donc pas envisageable dans notre cas, les souches responsables de mammites n'étant pas les mêmes que celle retrouvées dans les oreilles : dans l'élevage suivi, *Mcc* était la seule espèce isolée dans le lait alors que *Mmc* était l'espèce prédominante dans les oreilles des chèvres.

IV.1.b. Clone génétique (MLVA)

Le TR1 est un microsatellite très variable pour des souches tout venant. Le typage des souches a permis de conclure à la clonalité de tous les isolats de *Mcc* issus du lait, y compris avec la toute première souche isolée en début d'épisode pathologique. D'un point de vue épidémiologique, une seule et même souche circule dans le lait de cet élevage. En revanche, les souches de *Mcc* isolées dans le lait ne sont pas identiques avec celles d'oreilles.

On a donc pu supposer que le point de départ de la contamination de l'élevage était unique et que les souches de *Mcc* dans les oreilles des chèvres n'étaient pas celles responsables des mammites et que donc la transmission auriculaire n'en était pas la cause.

IV.2. Suivi de l'élevage

IV.2.a. Technique d'analyse pour le suivi d'un élevage

Dans cette étude, nous avons pu comparer l'utilisation de deux techniques d'analyse pour effectuer un suivi d'élevage caprin atteint d'un syndrome mycoplasmique : la culture suivie du MF-dot, méthode de référence, et la rtPCR, méthode récemment mise au point. Cette dernière est utilisée en première intention pour la détection des mycoplasmes et facilite le suivi par la rapidité et le nombre restreint des manipulations par rapport au MF-dot, bien qu'il reste à optimiser la technique d'extraction d'ADN. Le MF-dot est utilisé dans un deuxième temps car il reste une technique fastidieuse et longue mais permet néanmoins d'identifier l'espèce en cause, contrairement à la rtPCR qui ne différencie pas les espèces du groupe « *mycoides* ». L'identification de l'espèce en cause permet d'identifier toutes les espèces de mycoplasmes (opportunistes ou pathogènes). Elle permet aussi, à terme, d'étudier la clonalité ou non des souches présentes au sein d'un même élevage et donc de savoir si plusieurs sources de contamination existent et quel traitement antibiotique privilégier, le niveau de sensibilité aux antibiotiques n'étant pas le même entre les trois espèces du groupe « *mycoides* » [4, 5, 6, 44]. En revanche, avec les deux méthodes, une mauvaise homogénéisation du milieu de culture (pour le MF-dot) ou de l'échantillon (pour la rtPCR) et l'intermittence d'excrétion de mycoplasmes peuvent conduire à des faux négatifs.

Ensuite, le lait reste le prélèvement de choix pour un suivi d'élevage atteint de mammites mycoplasmiques. Les écouvillons auriculaires, bien que moins contraignant en terme de prélèvements et d'extraction ADN, ne sont pas représentatifs et la transmission auriculaire reste encore controversée [58].

Lors de la mise en place d'un suivi d'élevage, il serait donc intéressant :

- d'effectuer un prélèvement de lait sur toutes les chèvres malades ou l'ayant été et sur les chèvres avec seulement une augmentation du taux de cellules somatiques dans le lait et si possible sur les chèvres saines des mêmes lots que ces dernières ;
- d'analyser les laits par pool de 4 laits par rtPCR, en diluant les laits pour diminuer les faux négatifs (les protéines du lait colmatant la colonne d'extraction d'ADN) ;
- d'analyser individuellement les laits des pools positifs ;
- de réformer les chèvres atteintes, ou de les isoler, si possible, et de les traire en dernier jusqu'à leur réforme ;
- d'analyser par MF-dot les chèvres positives en rtPCR pour identifier l'espèce en cause ;
- d'étudier la clonalité des isolats par typage des souches ;
- de rechercher la source de contamination et de l'éliminer, si possible ;
- de suivre les résultats par rtPCR sur lait de tank les années suivantes.

IV.2.b. Mesures sanitaires et médicales mises en place avant le tarissement

Grâce au suivi microbiologique de l'élevage, nous avons pu déterminer quels animaux étaient à traiter, à réformer et conseiller l'éleveur pour une meilleure gestion du troupeau.

D'après la prévalence de *Mmc* dans le lait à mammite [103], nous nous attendions plutôt à identifier cette espèce dans cet élevage, ce qui a été le cas dans les oreilles alors que seul *Mcc* a été identifié dans le lait. De nombreuses chèvres étaient porteuses et excrétrices de mycoplasmes, y compris celles n'ayant jamais développé de signes cliniques. Il a donc été conseillé à l'éleveur de réformer les animaux ayant été malades, traités médicalement et toujours excréteurs ainsi que ceux dont les taux cellulaires étaient élevés.

Les traitements antibiotiques entrepris par l'éleveur possédaient l'AMM et ont permis une régression des symptômes dans la majorité des cas. Mais plusieurs rechutes ont été observées et ont donc obligé une reprise du traitement. Au vu de nos résultats, les traitements antibiotiques n'ont pas permis la guérison bactériologique.

Au tarissement, l'utilisation de Spéciorlac[®] a été conseillée chez les primipares ayant présenté des signes de mammites et/ou chez les chèvres dont le lait s'est révélé positif en mycoplasmes en rtPCR. Après le traitement au tarissement avec du Spéciorlac[®] accompagné de Tylan[®], ou avec du Nafpenzal[®].

Nous avons aussi insisté sur l'importance de continuer à constituer une banque colostrale à partir d'animaux sains et de continuer le traitement thermique pour éviter l'apparition d'arthrite mycoplasmique chez les chevreaux.

IV.2.c. Suivi des animaux après tarissement

Vingt-six chèvres ont été réformées et les résultats de rtPCR sur le lait se sont nettement améliorés par rapport aux premiers résultats mais ils sont restés encore à 22% de chèvres positives (36% avant la mise-bas). En revanche, le traitement au tarissement n'a pas permis de guérison bactériologique mais a probablement protégé les chèvres négatives avant la mise-bas d'une contamination. Depuis le début des mises-bas, une seule chèvre, sur 50 ayant mis bas, a contracté une mammite.

Il est nécessaire d'effectuer un suivi régulier, en particulier dès qu'une nouvelle augmentation des taux de cellules somatiques dans le lait est remarquée. Il est aussi conseillé de réformer la majorité des chèvres positives, toutes si possible, et que, jusqu'à leur réforme, elles soient traitées dans les dernières pour limiter au maximum la contamination des autres chèvres « saines » par l'intermédiaire de la machine à traire. En effet, la contamination entre les animaux dans cet élevage s'est faite par contact au sein des lots et lors de la traite. L'éleveur effectue un post-trempage mais pas de pré-trempage, il serait donc judicieux d'en effectuer un, suivi d'un essuyage. Une étude a montré que le pré-trempage permettait une diminution de plus de 30% de nouvelles mammites et qu'il avait peu d'impacts sur la qualité du

lait de tank [43]. En revanche, nous n'avons pas pu déterminer l'origine de la contamination de l'élevage au départ.

La contamination des chevrettes lors de la tétée a pu être évitée du fait de l'utilisation de lait en poudre et d'un colostrum thermisé (56°C pendant 1h) pour nourrir les jeunes animaux. L'efficacité d'un tel traitement est contestée et il semblerait préférable d'effectuer un traitement thermique de 60°C pendant 60min [78].

Chapitre III : Bilan et perspectives

Les deux principaux objectifs de ce travail étaient, d'une part, l'évaluation de la place des techniques de PCR pour le diagnostic des mycoplasmoses de ruminants dans les laboratoires vétérinaires en France et, d'autre part, l'évaluation de la faisabilité et des avantages d'un suivi par rtPCR d'un élevage caprin atteint d'agalactie contagieuse.

Tout d'abord, les techniques de PCR ne sont encore que très peu utilisées pour le diagnostic des mycoplasmoses chez les petits ruminants et la mise en culture suivi de l'identification par MF-dot reste la méthode de référence. Ceci laisse penser que l'épidémiosurveillance effectuée par VIGIMYC est assez représentative du terrain. En revanche, si la demande d'analyses mycoplasmiques devait augmenter dans les années à venir, les laboratoires sont équipés en thermocycleur et seraient prêts à une éventuelle évolution vers la PCR. Ses inconvénients majeurs sont le prix et l'incapacité de différencier les espèces du groupe « *mycoides* », mais la technique reste beaucoup plus rapide et plus simple et elle permet de traiter beaucoup de laits simultanément. Le délai de réponse étant beaucoup moins long, ceci pourrait augmenter la demande par les vétérinaires et donc rendre plus rentable la PCR pour les laboratoires, comme on a pu le remarquer pour les prélèvements provenant de bovins. En effet, le diagnostic de *Mb* s'effectue par une PCR monocible chez les bovins dans près de la moitié des laboratoires effectuant un grand nombre d'analyses mycoplasmiques (3/8). L'épidémiosurveillance de cette mycoplasme par VIGIMYC semble donc moins effective et les autres mycoplasmes pathogènes ou opportunistes, tel que *M. alkalescens* responsable de pneumonies chez les veaux [109], de mammites, d'arthrites et d'otites chez les bovins adultes [73], ne peuvent être identifiés par cette technique.

Ensuite, lors du suivi de l'élevage caprin atteint d'agalactie contagieuse, nous avons pu constater les avantages et inconvénients d'un suivi par la méthode rtPCR. D'une part, un nombre élevé de laits peut être traité simultanément et rapidement. Il est aussi possible de faire des pools de plusieurs laits pour diminuer les frais : si le résultat est négatif, tous les laits du pool le sont, dans le cas contraire, il faudra analyser les laits individuellement. D'autre part, la rtPCR permet d'identifier le groupe « *mycoides* » mais pas les espèces le composant. Or l'identification de la souche permet d'une part d'orienter de façon plus raisonnée les traitements antibiotiques et d'autre part d'étudier la clonalité des souches et donc d'analyser l'épidémiologie de la maladie au sein de l'élevage. Cette identification de l'espèce s'effectue d'abord par une mise en culture puis un MF-dot, technique de référence du réseau VIGIMYC. Or, la culture est moins sensible que la rtPCR et la technique d'identification est beaucoup plus fastidieuse et demande un certain savoir-faire du technicien. Lors d'un suivi d'élevage, il serait donc pertinent de coupler les deux méthodes : la rtPCR permettant de connaître rapidement le statut sanitaire de l'élevage, notamment pour les différents lots, et le MF-dot permettant de récupérer la souche mycoplasmique après la mise en culture, de connaître l'espèce en cause, d'orienter les traitements antibiotiques et d'étudier la clonalité de la souche circulante

par sous-typage au VNTR. Dans notre cas, l'infection a rapidement gagné tout le troupeau sans forcément de signes cliniques associés. Nous avons pu identifier les animaux porteurs et nous avons pu démontrer qu'une seule souche était bien impliquée dans l'épisode clinique de ce troupeau.

Enfin, cette étude a permis de déterminer quels prélèvements et quelle technique d'extraction d'ADN étaient à privilégier. Le lait reste le prélèvement de choix et doit être conservé à -80°C. Les analyses des écouvillons auriculaires ont révélées des espèces différentes de celles retrouvées dans le lait et même lorsqu'il s'agissait de *Mcc*, l'étude de clonalité a montré qu'il ne s'agissait pas des mêmes souches. La transmission ne s'effectue donc pas par voie auriculaire. Il aurait été intéressant d'effectuer ces analyses sur du liquide articulaire sur des animaux atteints d'arthrite pour étudier une éventuelle clonalité entre les souches, mais ces animaux-là avaient déjà été traités avec des antibiotiques avant notre arrivée et ne présentaient plus de signes d'arthrite. De plus, la ponction de liquide synovial ne peut devenir le prélèvement de choix face au lait, de par ses inconvénients : la contention et le risque d'arthrite septique suite à la ponction. Pour l'extraction d'ADN à partir du lait, il faut optimiser l'étape d'extraction et utiliser, par exemple, des billes magnétiques plutôt que des membranes, pour limiter le colmatage de ces dernières ou bien diluer le lait pour diluer les inhibiteurs, avec le risque d'apparition de faux négatifs à cause de la dilution. Enfin, des machines PCR portables sont en cours de développement, qui permettront aux vétérinaires de faire des analyses PCR à la clinique voire au chevet du malade en ferme, avec les inconvénients et avantages que cela implique [71].

Pour conclure, la règle d'une souche par foyer, démontrée dans un foyer caprin à *Mmc* [103], est confirmée dans l'élevage suivi avec un unique clone de *Mcc* circulant dans le lait. Ce dernier n'a pas connu pour le moment de nouvel épisode clinique d'agalactie contagieuse suite aux mise-bas, à l'exception d'une mammite. Mais une nouvelle analyse sur lait de tank a été réalisée le 15 août 2013, soit neuf mois après la phase clinique aigue, dans le cadre du projet MYCAPTANK. Le lait s'est avéré être positif à *Mcc*. Le sous-typage moléculaire par MLVA a révélé que ce clone correspondait bien au clone majoritaire qui circulait dans le lait de cet élevage au moment du pic de pathologie. Ceci confirme l'existence d'un portage et d'une excrétion de longue durée des mycoplasmes après l'épisode clinique et malgré les différents traitements entrepris [103]. Il est donc fortement conseillé à l'éleveur de maintenir toutes les conditions d'hygiène et de réforme pour éviter une nouvelle flambée d'agalactie contagieuse au sein de l'élevage. De plus, les conséquences de la coexistence de plusieurs espèces de mycoplasmes chez un même animal ou au sein d'un troupeau, le rôle épidémiologique des porteurs sains et le risque de transmission de mycoplasmes par des espèces sauvages aux troupeaux de ruminants restent encore inconnus [53].

CONCLUSION

Le principal objectif de ces travaux était d'évaluer la place et l'intérêt des techniques de PCR pour le diagnostic et le suivi clinique des mycoplasmoses chez les ruminants. Cette évaluation a été faite, d'une part, via une enquête auprès des laboratoires vétérinaires de France qu'ils soient membres ou non du réseau d'épidémiosurveillance VIGIMYC et d'autre part, via le suivi clinique par rtPCR d'un foyer caprin d'agalactie contagieuse.

Pour la première partie, il apparaît que les techniques de PCR sont encore très peu utilisées par les laboratoires pour le diagnostic des mycoplasmoses chez les petits ruminants ; la mise en culture suivie de l'identification par MF-dot telle que déployée dans le réseau VIGIMYC reste la méthode de référence. Ceci suggère que les données issues de l'épidémiosurveillance effectuée par VIGIMYC sont assez représentatives de la situation réelle pour les petits ruminants. En revanche, en filière bovine, les techniques de PCR commencent à se démocratiser au sein des laboratoires vétérinaires français. Le déploiement d'une stratégie diagnostique efficace par PCR nécessite néanmoins une bonne connaissance en amont des agents étiologiques et de l'épidémiologie des mycoplasmoses.

Lors du suivi de l'élevage caprin atteint d'agalactie contagieuse, nous avons démontré que la méthode de rtPCR permet de donner une réponse rapide à l'éleveur qui peut ainsi gérer au mieux son troupeau. Toutefois, le kit de rtPCR utilisé ne distinguant pas les différents mycoplasmes au sein du groupe « *mycoides* », ce diagnostic ne permet pas d'adapter les traitements antibiotiques au mieux. C'est seulement à travers la mise en culture des souches circulantes dans l'élevage que nous avons pu les identifier au niveau de l'espèce et réaliser leur sous-typage et donc démontrer leur clonalité. Lors d'un suivi d'élevage, il serait donc pertinent de coupler les deux méthodes : la rtPCR, permettant de connaître rapidement le statut sanitaire de l'élevage, et la culture et le MF-dot, permettant de conserver et d'identifier la souche mycoplasmique en cause et d'étudier la clonalité de la souche circulante par sous-typage.

Thèse de Mme Bonnet Sandrine

Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire


Dr Claire BECKER
Pathologie du Bétail
VetAgro Sup
1, Avenue Bourgelat
69280 MARCY L'ETOILE - FRANCE

Le Directeur général
VetAgro Sup


Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Le Président de la thèse
Groupe Hospitalier Edouard Herriot
Unité Hygiène, Epidémiologie Prévention


Professeur Ph. VANHEMS
Bâtiment 1 - 2^{ème} étage
Place d'Arsonval
69437 LYON cedex 03
France

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le **05 JUIN 2014**

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur **F. N. GILLY**



BIBLIOGRAPHIE

- [1] AARESTRUP F.M., KEMPF I. (2006)
Mycoplasma.
In : Aarestrup F.M. (eds). Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin.
ASM Press, Washington, 239-248.
- [2] ANONYME. (2012)
Annuaire Vétérinaire ROY.
Les Editions de Point Vétérinaire, Maisons-Alfort. 1620p.
- [3] ANONYME. (2012)
Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires.
Les Editions du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort. 2304p.
- [4] ANTUNES N.T., et al. (2007)
In Vitro susceptibilities of *Mycoplasma putrefasciens* field Isolates.
Antimicrob. Agents Chemother., 51, (9), 3452-3454.
- [5] ANTUNES N.T., et al. (2007)
In Vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*
large colony type to 15 antimicrobials.
Vet. Microbiol., 119, 72-75.
- [6] ANTUNES N.T., et al. (2008)
In Vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*.
Vet. J., 177, 436-438.
- [7] ARIZA-MIGUEL J., RODRIGUEZ-LAZARO D., HERNANDEZ M. (2012)
A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain.
BMC Veterinary Research, 8, (171).
- [8] ARJOON A., SAYLOR C., MAY M. (2012)
In Vitro efficacy of antimicrobial extracts against the atypical ruminant pathogen
Mycoplasma mycoides subsp. capri.
BMC Complementary and Alternative Medicine, 12, (109).
- [9] AZIZI S., TAJBAKHS E., REZAI A., NEKOU EI S.H., NAMJOO A.R. (2011)
The role of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in pneumonic
lungs of slaughtered sheep.
Revue Méd. Vét, 162, (6), 310-315.

- [10] BARRUCAND P., LE PAPE M., LAUTIER G., DE CREMOUX R. (2012)
Influence des concentrations en cellules somatiques sur le comportement du lait de chèvre.
Bulletin des GTV, (66), 109-114.
- [11] BECKER C. et al. (2012)
Validation of a Multiplex Real-Time PCR for Contagious Agalactia Diagnosis in Small Ruminants.
In : International Organization for Mycoplasma, Toulouse.
- [12] BECKER C., RAMOS F., SELLAL E., MOINE S., POUMARAT F., TARDY F. (2012)
Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants.
Journal of Microbiological Methods, 7 p.
- [13] BENSON G. (1999)
Tandem repeats finder : a program to analyse DNA sequences.
Nucleic Acids Research, 27, (2), 573-580.
- [14] BERGONIER D. (2008)
L'agalactie contagieuse, principal syndrome mycoplasmaïque des petits ruminants.
Académie vétérinaire de France. Communication personnelle.
- [15] BERGONIER D., POUMARAT F. (1996)
Agalactie contagieuse des petits ruminants : épidémiologie, diagnostic et contrôle.
Revue scientifique et technique, 15, 1431-1475.
- [16] BERGONIER D., BERTHELOT X. (2007)
Mycoplasmoses mammaires et Agalactie contagieuse des petits ruminants.
Bulletin des GTV 2007, 39, 45-54.
- [17] BERGONIER D., BERTHELOT X. (2007)
Les mycoplasmoses chez les petits ruminants. L'agalactie contagieuse.
Nouv. Prat. Vét. Elevages et santé, (5), 43-51.
- [18] BERGONIER D., BERTHELOT X. (2008)
Mycoplasmoses des petits ruminants : le syndrome de l'agalactie contagieuse.
Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 161, 167-178.
- [19] BERGONIER D., BERTHELOT X., POUMARAT F. (1997)
Contagious agalactia of small ruminants : current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control.
Revue scientifique et technique, 16, 848-873.
- [20] BERGONIER D., DE CREMOUX R., BERTHELOT X. (2010)
Spécificités du traitement au tarissement chez les petits ruminants.
Bulletin des GTV, (56), 15-26.

- [21] BERGONIER D., VAN DE WIELE A., MARENDA M., BERTHELOT X. (2002)
Syndromes mycoplasmiques. L'agalactie contagieuse chez les ovins.
Point vét., 33, (N° Spécial : Pathologie ovine et caprine), 52-57.
- [22] BERGONIER D., POUMARAT F., PEPIN M., LEBRET P., BERTHELOT X. (1996)
Agalactie contagieuse des petits ruminants : clinique et épidémiologie.
Le Point Vétérinaire, 28, (180), 31-39.
- [23] BERGONIER D., BLAZIOT T., LARRICQ JM., TICOULET D., ARRANZ JM.,
BERTHELOT X. (2010)
Agalactie contagieuse des petits ruminants : situation épidémiologique et mesures de
contrôle.
Bulletin des GTV, (56), 35-46.
- [24] BERGONIER D. et al. (1997)
Etat actuel et perspectives du contrôle de l'agalactie contagieuse des petits
ruminants.
Le Point Vétérinaire, 28, (186), 33-42.
- [25] BERTEL Armel. (2002)
Les boiteries chez les ovins.
Fiche de la SNGTV, (39), 4p.
- [26] BIO-X Diagnostics. (2010)
ANTIGENIC PULMOTEST FOR DETECTION OF *MYCOPLASMA BOVIS*
Notice d'utilisation de la trousse. 4p.
- [27] BISWAS S., ROLAIN J. M. (2013)
Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to
culture.
J. Microbiol. Methods, 92, 14-24.
- [28] BRARD C. (1994)
L'agalactie contagieuse.
Bull. Group. Tech. vét., (94-3-144), 115-117.
- [29] BRETON M., *et al.* (2012)
Distribution and diversity of mycoplasma plasmids : lessons from cryptic genetic
elements.
BMC Microbiology, 12, (257).
- [30] BRUGERE PICOUX J. (2004)
Agalactie contagieuse.
Maladies des moutons. 2° édition. Paris : Ed. France agricole, 205-207.
- [31] CHARTIER C. (2009)
Pathologie caprine. Du diagnostic à la prévention.
Editions du point vétérinaire, Rueil-Malmaison, 325p.

- [32] CHARTIER C., PARAUD C., MERCIER P., FRANQUET N., VALAS S. (2010)
Prévention néonatale des infections des caprins.
Point vét., 41, (302), 41-48.
- [33] CHAZEL M., TARDY F., LE GRAND D., CALAVAS D., POUMARAT F. (2010)
Mycoplasmoses of ruminants in France : recent data from the national surveillance network.
BMC Veterinary Research, 6, (32).
- [34] CITTI C. (2006)
Les Mycoplasmes : stratégies d'adaptation et de persistance de bactéries minimales.
Le Nouveau Praticien Vétérinaire – Elevage et Santé, (3), 15-21.
- [35] CITTI C., NOUVEL LX., BARANOWSKI. (2010)
Phase and antigenic variation in mycoplasmas.
Future Microbiology, (5), 1073-1085.
- [36] CONTRERAS A., LUENGO C., SANCHEZ A., CORRALES J.C. (2003)
The role of intramammary pathogens in dairy goats.
Livest. Prod. Sci., 79, 273-283.
- [37] CORRALES J.C., SANCHEZ A., LUENGO C., POVEDA J.B., CONTRERAS A. (2004)
Effect of Clinical Contagious Agalactia on the Bulk Tank Milk Somatic Cell Count in Murciano-Granadina Goat Herds.
J. Dairy Sci., 87, 3165–3171.
- [38] CORRALES J., et al. (2007)
Contagious agalactia in small ruminants.
Small Ruminants Research, (68), 154-166.
- [39] COTTEW G.S., YEATS F.R. (1982)
Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats.
Aust. Vet. J., 59, (3), 77-81.
- [40] DAMASSA A.J. (1990)
The ear canal as a culture site for demonstration of mycoplasmas in clinically normal goats.
Aust. Vet. J., 67, 267-268.
- [41] DAMASSA A.J., BROOKS D.L. (1991)
The external ear canal of goats and other animals as a *Mycoplasma* habitat.
Small Ruminant Res., 4, 85-93.
- [42] DAMASSA A.J., WAKENELL P.S., BROOKS D.L. (1992)
Mycoplasmas of goats and sheep.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, (4), 101-113.

- [43] DE CREMOUX R., et al. (2010)
Efficacité et faisabilité du pré-trempage des trayons chez la chèvre.
Bulletin des GTV, (56), 27-34.
- [44] DE GARNICA M.L., et al. (2013)
Isolation, molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of isolates of *Mycoplasma agalactiae* from bulk tank milk in an endemic area of Spain.
J. Appl. Microbiol., 114, (6), 1575-1581.
- [45] DE LA FE C., ASSUNÇÃO P., SAAVEDRA P., TOLA S., POVEDA C., POVEDA J.B. (2007)
Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats.
Vaccine, 25, 2340–2345.
- [46] DE LA FE C. et al. (2008)
Effects on goat milk quality of the presence of *Mycoplasma* spp. in herds without symptoms of contagious agalactia.
J. Dairy. Res., 76, (1), 20-3.
- [47] DE LA FE C. et al. (2009)
Latent infection of male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies capri at an artificial insemination centre.
Vet J., 186, (1), 113-115.
- [48] DENOEUDE F., VERGNAUD G. (2004)
Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains : a web-based resource.
BMC Bioinformatics, 5, (4).
- [49] DERNBURG A., LE GRAND D., ARCANGIOLI M.A., CALAVAS D., POUMARAT F. (2004)
Le réseau de surveillance des mycoplasmoses est formalisé.
Point vét., 35, (246), 12-13.
- [50] FIOCRE B., GUERAUD J.M. (1991)
L'arthroencéphalite virale de la chèvre (AEVC). Relations entre rétrovirose et mycoplasmoses. Problèmes actuels et perspectives.
Bull. Acad. Vét. Fr., 64, (3), 317-323.
- [51] GAY E., CAZEAU G., JARRIGE N., CALAVAS D. (2012)
Utilisation des antibiotiques chez les ruminants domestiques en France : résultats d'enquêtes de pratiques auprès des éleveurs et des vétérinaires.
Bull. Epid., santé animale et alimentation, (53), 8-11.

- [52] GIL M.C., et al. (1999)
Isolation of Mycoplasmas from the External Ear Canal of Goats Affected with Contagious Agalactia.
Vet. J., 158, 152–154.
- [53] GOMEZ-MARTIN A., AMORES J., PATERNA A., DE LA FE C. (2013)
Contagious agalactia due to *Mycoplasma spp.* In small dairy ruminants : Epidemiology and prospects for diagnosis and control.
Vet. J., 198, 48-56.
- [54] GOMEZ-MARTIN A., et al. (2012)
Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers.
Vet. J., 157, 355-362.
- [55] HARDY D. (Page consultée en 2012).
Contrôle laitier - Une production moyenne record de 842 kilos de lait par chèvre, [en ligne].
Adresse URL : <http://www.la-chevre.fr>.
- [56] Institut de l'élevage. (2008)
Maladies de bovins.
France Agricole Editions, Paris, 797p.
- [57] JARRIGE N., CALAVAS D., GAY E. (2011)
Enquête épidémiologique sur les pratiques antibiotiques dans les élevages ovins.
Bulletin des GTV, (60), 113-117.
- [58] JIMENA O.N., et al. (2009).
Association of *Raillietia caprae* with the presence of mycoplasmas in the external ear canal of goats.
Prev. Vet. Med., 92, 150-153.
- [59] KINDE H., DAMASSA A.J., WAKENELL P.S., PETTY R. (1994)
Mycoplasma infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype).
J. Vet. Diagn. Invest., 6, 423-427.
- [60] KITTELBERGER R., et al. (2006)
Comparison of four diagnostic tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*.
N. Z. Vet. J., 54, (1), 10-15.
- [61] LE GRAND D., SARAS E., BLOND D., SOLSONA M., POUMARAT F. (2004)
Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants.
Vet. Res., 35, 635-649.

- [62] LE GRAND D., ARCANGIOLI M.A., CALAVAS D., BEZILLE P., POUMARAT F. (2008)
Mycoplasmes et mycoplasmoses bovines : actualités.
Bull. Acad. Vét., 161, (2), 159-166.
- [63] LE GRAND D., ARCANGIOLI M.A., GIRAUD N., POUMARAT F., BEZILLE P., BERGONIER D. (2004)
Conduite à tenir face à des mammites à mycoplasmes.
Point vét., 35, (245), 34-37.
- [64] LOPEZ-ENRIQUEZ L. et al. (2007)
Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in Milk by real-time PCR
AEM, 73, (11), 3747-3751
- [65] MADEC J-Y. (2012)
Antimicrobial resistance in animals in France : highlights and trends and main issues.
Bull. Acad. Vét., 165, (2), 103-108.
- [66] MANSO-SILVAN et al. (2009)
Mycoplasma leachii sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. Bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.
IJSEM, 59, 1353-1358.
- [67] MARKHAM P. F., NOORMOHAMMADI A. H. (2005)
Diagnosis of mycoplasmosis in animals.
In A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control*. Horizon bioscience, Norfolk, 355-382.
- [68] MERCIER P., BERGONIER D. (2003)
Le syndrome mycoplasmiq ue caprin.
Point vét., 34, (239), 30-34.
- [69] MERCIER P., COUTINEAU H., LENFANT D., DECOUX V. (2000)
Un épisode d'agalactie causé par *Mycoplasma putrefaciens* dans un troupeau caprin.
Point vét., 31, (208), 69-72.
- [70] MERCIER P., PELLET M.-P., MORIGNAT E., CALAVAS D., POUMARAT F. (2007)
Prevalence of mycoplasmas in external ear canal of goats: Influence of the sanitary status of the herd.
Small Ruminant Research, 73, 296-299.
- [71] MILLEMANN Y., BELBIS G., ASSIE S., MAILLARD R. (2014)
Utilisation de la PCR en diagnostic vétérinaire : est-ce la panacée ?
In : JNGTV (eds). *Les examens complémentaires : atouts du diagnostic et de la prescription raisonnée*, Reims, 21 mai-23 mai 2014, SNGTV, Yvetot, 135-141.

- [72] Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. (Page consultée en 2012).
Agreste, [en ligne].
Adresse URL : <http://agreste.agriculture.gouv.fr>.
- [73] NICHOLAS R., AYLING R., MACAULIFFE L. (2008)
Mycoplasma diseases of ruminants.
CAB International, Wallingford, 239p.
- [74] NICOLET J. (1996)
Animal mycoplasmoses : a general introduction.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot., 15, (4), 1233-1240.
- [75] NICOLSON GL, NASRALLA MY, NICOLSON NL. (1998)
The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infections.
Antimicrobials and infectious diseases newsletter, 17, (11), 81-87.
- [76] Office International des Epizooties. (1987)
Les mycoplasmoses des ruminants.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot., 6, (3), 547-824.
- [77] Office International des Epizooties. (1996)
Animal mycoplasmoses and control.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot., 15, (4), 1225-1605.
- [78] PATERNA A., et al. (2013)
Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in heat treated goat colostrum.
Vet. J, 196, (2), 263-265.
- [79] PEREYRE S., et al. (2013)
Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.
JCM, 51, (10), 3314-3323.
- [80] PERREAU P. (1979)
Le syndrome d'agalactie contagieuse de la chèvre.
Les cahiers de médecine vétérinaire, fiche technique vétérinaire n°117.
- [81] PICAUVET D. (1991)
La pleuropneumonie contagieuse de la chèvre (PPCC).
Revue Méd. Vét., 152, (5), 377-387.
- [82] PIRISI A., LAURENT A., DUBEUF J.P. (2007)
Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality.
Small Ruminant Research, 68, 167-178.

- [83] PONCELET J.L. (2012)
Prescription hors A.M.M des médicaments – Cascade.
Fiche de la SNGTV, (118), 25p.
- [84] POUMARAT F, PERRIN B, LONGCHAMBON D. (1991)
Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot).
Vet. Microbiol., 29, 329-338.
- [85] POUMARAT F, LE GRAND D, BERGONIER D. (1996)
Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique.
Le Point Vétérinaire, 28, (180), 761-767.
- [86] POUMARAT F, CHAZEL M., TARDY F., LE GRAND D. (2012)
VIGIMYC le réseau national d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants. Compte-rendu d'activité 2011.
Journée VIGIMYC 2012.
- [87] POUMARAT F., TARDY F., JARRIGE N., CHAZEL M., LE GRAND D. (2011)
VIGIMYC, Le réseau d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants, Rapport d'activité 2011.
Anses laboratoire de Lyon et VetAgro-Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Lyon, 17 p.
- [88] POUMARAT F. et al. (1998)
Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF-dot).
Methods Mol. Biol., 104, 113-118.
- [89] POUMARAT F. et al. (2009)
VIGIMYC, le réseau national d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants, bilan 2003-2007.
Bulletin épidémiologique, (31), 4-8.
- [90] POUMARAT F. et al. (2012)
Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by *Mycoplasma agalactiae*.
BMC Veterinary Research, 8, 109.
- [91] POVEDA J. B. (1998)
Biochemical characteristics in mycoplasma identification.
Methods Mol. Biol., 104, 69-78.
- [92] POVEDA J. B., NICHOLAS R. (1998)
Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests.
Methods Mol. Biol., 104, 105-111.

- [93] PUGH D. G., BAIRD A. N. (2012)
Sheep and Goat Medicine.
Elsevier, Missouri, 2nd Ed, 629p.
- [94] RAZIN S. (1985)
Molecular Biology and Genetics of Mycoplasmas (Mollicutes).
Microbiological Reviews, 49, (4), 419-455.
- [95] RAZIN S., YOGEV D., NAOT Y. (1998)
Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.
Microbiol Mol Biol Rev, New York, 62, (4), 1094-1156.
- [96] Réseau d'Excellence Caprine Poitou-Charente. (Page consultée le 16 avril 2014).
REXCAP Terre des Chèvres, [en ligne].
Adresse URL : <http://pro.terresdeschevres.fr/>
- [97] RHUNKE HL, ROSENDAL S. (1994)
Useful protocols for diagnosis of animal Mycoplasmas.
Addendum I. Media formulations and techniques. In : WHITFORD HW,
ROSENBUSCH FF,
LAUERMANN LH, 5th ed., Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis, Iowa
States University Press, 141-155.
- [98] RODRIGUEZ J.L., ERMEL R.W., KENNY T.P., BROOKS D.L., DAMASSA A.J.
(1997)
Polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion for selected
members of the "*Mycoplasma mycoides* cluster" and *Mycoplasma putrefaciens*.
J. Vet. Diag. Invest., 9, 186-190.
- [99] ROSENBUSCH RF. (1994)
Biology and taxonomy of the mycoplasmas.
Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis. 5th ed, Iowa States University
Press, 3-11.
- [100] RUFFIN D.C. (2001)
MYCOPLASMA INFECTIONS IN SMALL RUMINANTS.
Vet Clin North Am Food Anim Pract, 17, (2), 315-329.
- [101] SCHAEVERBEKE T., BEBEAR C.M., BEBEAR C. (1999)
Mycoplasmes et arthrités.
La lettre de l'infectiologue, 15, (4), 141-145.
- [102] SWOG. (Page consultée en 2012)
Binomial Confidence Interval, [en ligne].
Adresse URL : http://www.swogstat.org/stat/public/binomial_conf.htm.

- [103]TARDY F., MERCIER P., SOLSONA M., SARAS E., POUMARAT F. (2007)
Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats : Prevalence and typing.
Vet Microbiol, 121, (3-4), 268-277.
- [104]TARDY F., GAURIVAUD P., TRICOT A., MAIGRE L., POUMARAT F. (2008)
Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the '*Mycoplasma mycoides*' cluster : is DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes suitable ?
Letters in Applied Microbiology, (48), 210-217.
- [105]TARDY F., ARCANGIOLI M.A., DEVILLECHAISE P., POUMARAT F., LE GRAND D. (2009)
Observation clinique un foyer de mammites à *Mycoplasma putrefasciens* en élevage caprin.
Nouv. Prat. Vét. Élevages et santé, 2, (11), 48-52.
- [106]TARDY F., et al. (2011)
Comparison of Isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* from Asymptomatic and Septicaemic Goats.
J. Comp. Path., 144, 70-77.
- [107]TARDY F., et al. (2012)
Emergence of Atypical *Mycoplasma agalactiae* Strains Harboring a New Prophage and Associated with an Alpine Wild Ungulate Mortality Episode.
AEM, 78, (13), 4659-4668.
- [108]THOMAS A., MAINIL J., LINDEN A. (2003)
Mycoplasma bovis : synthèse des connaissances actuelles.
Ann. Méd. Vét., (147), 23-32.
- [109]THOMAS A., et al. (2002).
Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium.
Veterinary Record, 151, 472-476.
- [110]VILEI E.M., KORCZAK B.M, FREY J. (2006)
Mycoplasma mycoides subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies.
Vet. Res., 37, 779–790.
- [111]VILEI E.M., et al. (2007)
Validation and diagnostic efficacy of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Mycoplasma conjunctivae* in the eyes of infected Caprinae.
Journal of Microbiological Methods, 70, 384-386.
- [112]WAITES K. B., BEBEAR C. M., ROBERTSON J. A., TALKINGTON D. F., KENNY G. E. (2001) Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections.
American Society for Microbiology, Washington D. C., 30p.

[113]WHITFORD HW. (1994)

Isolation of mycoplasmas from clinical specimens.

Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis, 5th ed, Iowa States University Press, 12-14.

[114]WHITFORD H.W., ROSENBUSCH R.F., LAUERMAN L.H. (1994)

Mycoplasmosis in animals : laboratory diagnosis.

Iowa State University Press, Ames, 173p.

[115]ZAVAGLI V. (1951)

L'agalactie contagieuse des brebis et des chèvres.

Bull. Off. Int. Epizoot., 36, 336-362.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche technique Méthodes d'analyse en santé animale Recherche par isolement de *Mycoplasma spp.* chez les ruminants

INTRODUCTION

Chez les ruminants, les mycoplasmes sont principalement responsables d'infections pulmonaires, génitales, mammaires, articulaires et oculaires. Parmi les nombreuses espèces susceptibles d'être isolées chez les ruminants, seules certaines s'avèrent réellement pathogènes. En France, *Mycoplasma (M.) agalactiae*, *M. capricolum subsp. capricolum* et *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides biotype large colony* sont les agents de l'agalactie contagieuse des petits ruminants. La péripneumonie contagieuse bovine due à *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides biotype small colony* n'est pas présente actuellement sur le territoire, mais le risque d'une résurgence comme celle survenue dans les années 80/90 ne doit pas être négligée. L'impact économique des infections à *M. bovis* chez les bovins est important et s'accroît rapidement. Certaines espèces non pathogènes comme *M. bovirhinis* ou *M. arginini* sont très fréquemment isolées. Enfin le degré de pathogénicité d'espèces plus sporadiquement isolées (*M. canis*, *M. alkalescens*, etc.) reste à préciser.

PRECAUTIONS DE SECURITE

Les mycoplasmes des ruminants ne présentent pas de danger connu pour l'homme, en revanche, compte tenu des dangers de dissémination pour les ruminants, il est recommandé d'observer les précautions de sécurité applicables aux germes de classe 2.

1 – OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette technique a pour objet la recherche de bactéries de la classe des Mollicutes (Mycoplasmes au sens large) à partir de prélèvements pulmonaires, génitaux, mammaires, articulaires et oculaires, réalisés sur des ruminants. Cette recherche peut se faire sur des animaux présentant des signes cliniques ou pour détecter des animaux infectés inapparents.

Il n'existe actuellement aucun milieu suffisamment polyvalent pour assurer l'isolement de tous les Mollicutes susceptibles d'être rencontrés chez les ruminants. Certaines espèces dont *M. dispar* et le genre *Ureaplasma* ne cultivent pas sur les milieux habituellement proposés dans le commerce et exigent des formules appropriées.

Le peu de sélectivité des caractères biochimiques fait que l'identification requiert des techniques particulières qui ne seront pas traitées ici. La caractérisation des souches isolées doit être systématiquement effectuée compte tenu de la grande fréquence d'isolement d'espèces non pathogènes n'ayant donc aucune signification étiologique et de la nécessité de faire le diagnostic différentiel avec la péripneumonie contagieuse bovine et avec l'agalactie contagieuse des petits ruminants, maladies inscrites sur la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale.

2 - RÉFÉRENCES

Nicholas R., Baker S. : Recovery of Mycoplasma from animals from Methods in molecular biology vol 104: Mycoplasma Protocols. Edited by Miles, Roger and Nicholas Robin. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. 1998, 37-43
Provost A., Perreau P., Bréard A., Le Goff C., Martel J.L. Cottew G.S. Péripleurite contagieuse bovine. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 1987, 6, 565-624.

3 - DEFINITIONS

3.1 - PBS : tampon phosphate.

3.2 - Solution à x pour cent (v/v) : solution à x volumes du produit considéré dans (100-x) volumes de diluant.

4 – PRINCIPE ET REACTIONS

La technique consiste en l'ensemencement du prélèvement sur milieu spécifique.

5 – DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE, REACTIFS ET AUTRES PRODUITS

5.1 - Diluants

5.1.1 Eau ultrapure

Se reporter au programme d'accréditation.

5.1.2 Tampon phosphate (PBS) pH 7,2 0,1

Préparer une solution concentrée :

- Chlorure de sodium (NaCl) 87,0g
- Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{NaH}_2\text{P}_042\text{H}_2\text{O}$) 20,1g
- Hydrogénophosphate disodique dihydraté ($\text{Na}_2\text{HP}_042\text{H}_2\text{O}$) 60,0g
- Eau (5.1.1) qsp 1000ml

- Stériliser par filtration à $0,22\mu\text{m}$ ou par autoclavage à $121 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 10 mn.

- Au moment de l'emploi diluer au 1/10 (v/v) en eau (5.1.1) stérile.

5.2 - Milieux de culture

La culture des mycoplasmes nécessite des milieux spécifiques de composition complexe. Différentes formules ont été proposées (Nicolas et al) dont le milieu DE (Provost et al). Des milieux spécifiques adaptés aux principaux mycoplasmes des ruminants (Cf § 1) sont désormais disponibles dans le commerce. Ils sont garantis d'une qualité constante de lot à lot très difficile à maintenir lors de production en interne. On suivra les indications du fabricant pour la préparation et la conservation de ces milieux.

Les mycoplasmes ont des caractéristiques de culture très particulières : croissance longue souvent plusieurs jours, turbidité très faible en bouillon et colonies microscopiques sur gélose. La culture de mycoplasmes exige ainsi une certaine expérience. Des essais préalables avec des souches sélectionnées représentatives sont nécessaires pour les néophytes. De telles souches peuvent être demandées auprès de l'Anses - laboratoire de Lyon.

5.3 - Inhibiteurs de croissance

Pour éviter le développement des bactéries autres que des Mollicutes, des inhibiteurs sélectifs de croissance sont ajoutés dans les milieux mycoplasmes. La plupart des milieux commerciaux contiennent de l'acétate de thallium parfois de la pénicilline.

Si de l'acétate de thallium entre déjà dans la composition du milieu, pour la plupart des applications il suffit de rajouter de l'amoxicilline 2g par litre. Dans le cas inverse il convient de proscrire l'utilisation et la manipulation de l'acétate de thallium, certes très efficace, mais hautement toxique. Le cocktail d'antibiotiques suivant est proposé : ampicilline 2g, amphotéricine 25mg (dilué en DMSO 1ml), colistine 75mg, H₂O 99ml. Diluer au 1/100 (v/v) en milieu mycoplasmes.

Pour les laits de tank souvent fortement contaminés, l'addition de céfopérazone 100UI/ml ou 67 mg/ml permet de limiter le nombre d'essais rendus ininterprétables suite à la multiplication de bactéries classiques.

6 – APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de bactériologie et notamment :

6.1 - Tubes stériles de volume adapté.

6.2 - Boîtes de Pétri de diamètre 55 ± 2 mm.

6.3 - Dispositif de broyage adapté recommandé.

6.4 -Pipettes permettant de réaliser des volumes de 200 µl.

6.5 - Incubateur à CO₂

7 - ECHANTILLONS

Ils sont variés. A titre d'exemple, on peut prélever :

7.1 - sur l'animal vivant

Liquides de lavage trachéo-bronchique ou broncho-alvéolaire avec du PBS (Chapitre 5.1.2), prélèvements aseptiques de lait, de liquide d'arthrite, avortons et enveloppes placentaires, écouvillonnages des cavités nasales, génitales et de la conjonctive oculaire. Les écouvillons doivent être placés en tubes stériles contenant du bouillon mycoplasme.

7.2 - Sur l'animal mort

Poumons, noeuds lymphatiques rétro-mammaires, produits de raclage ou fragments de la membrane synoviale ou de la conjonctive oculaire placés dans un tube stérile contenant du bouillon mycoplasme.

Les prélèvements doivent être conservés à température comprise entre 2°C et 8°C et acheminés au laboratoire dans un délai de 24 h à 48 h. Si le délai d'acheminement est supérieur, ils doivent être conservés à température inférieure ou égale à -18° C.

8 - PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ANALYSE

8.1 - Organes

On peut déposer directement un fragment d'organe, prélevé stérilement, dans un tube contenant 2 ml de bouillon mycoplasme ou mieux réaliser un broyat avec un dispositif de broyage adapté en prélevant stérilement 1 g environ de l'organe à traiter et en le plaçant dans 9 ml de PBS (chapitre 5.1.2).

8.2 - Autres prélèvements

Ils sont soit liquides, soit conditionnés en milieu liquide et sont utilisés sans préparation.

9 – MODE OPERATOIRE

9.1 - Ensemencement

200 µl du prélèvement est ensemencé dans un tube contenant 1,8 ml de bouillon mycoplasme. Ensuite, à partir de ce tube primaire, on réalise quatre dilutions successives de 10 en 10 par transfert de 200 µl dans 1,8 ml de bouillon mycoplasme. Il est impératif d'ajouter à chaque série un tube témoin de bouillon mycoplasme non ensemencé.

9.2 - Première étape d'incubation

Elle est réalisée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 4 jours, sous atmosphère saturée en H₂O et enrichie à 5% de CO₂ de façon à favoriser la croissance des mycoplasmes.

9.3 - Première lecture et repiquages

La croissance dans les tubes est évaluée en observant ces tubes à contre jour en comparaison avec le tube témoin non ensemencé, les tubes (dont le témoin) ayant été brièvement agités au préalable.

9.3.1 Si une augmentation de turbidité dans au moins une des 4 dernières dilutions est détectable

Dans ce cas, les dilutions, pour lesquels une croissance est supposée, sont repiquées en gélose. Ces géloses sont préparées le jour même, une fois coulées et refroidies, elles sont séchées 5mn à l'étuve (ouvertes et renversées sur le couvercle) puis ensemencées en déposant une goutte étalée en stries. Les tubes ayant servi à ensemencer les géloses sont stockés à une température inférieure ou égale à -18°C en attente de leur transfert pour l'identification.

9.3.2 Si aucune augmentation de turbidité dans les 4 dernières dilutions n'est détectable

Les deux premières dilutions sont repiquées en aveugle par transfert de 200µl dans 1,8 ml de milieu mycoplasme.

9.4 - Seconde étape d'incubation

Les géloses ou les tubes de repiquages accompagnés des dilutions réalisées en 9.1 sont placées pour 4 jours à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmosphère saturée en H₂O enrichie en 5% de CO₂.

9.5 - Seconde lecture

9.5.1 Les géloses

Elles sont observées sous une loupe binoculaire (grossissement 2 à 15) en éclairage inversé (incliné à 45° si possible) pour rechercher des micro-colonies de mycoplasmes (en forme d'oeuf sur le plat et au centre incrusté). La présence de telles colonies confirme la présence d'un mycoplasme dans le prélèvement étudié. La gélose est conservée à $+4^\circ\text{C}$ scellée sous film plastique en attente de son transfert pour l'identification.

9.5.2 Les repiquages en bouillon

Si une augmentation de la turbidité est détectable dans au moins un repiquage la procédure est reprise au chapitre 9.3.1. En revanche si aucune augmentation de turbidité n'apparaît dans les repiquages, la recherche de mycoplasmes est considérée comme négative.

9.6 - Remarques

9.6.1 Il est impératif de limiter au maximum les repiquages successifs et de réserver pour l'identification les tubes de premier passage ou de première culture détectable. En effet dans 10 à 20% des prélèvements, plusieurs espèces mycoplasmatiques sont simultanément retrouvées. Les repiquages successifs favorisent les espèces à croissance rapide, c'est souvent le cas des saprophytes (*M. arginini*, *M. bovirhinis*, etc..) et éliminent progressivement les espèces à croissance plus lente comme beaucoup de pathogènes (*M. bovis*, *M. ovipneumoniae*, *M. agalactiae*, etc.), conduisant à un diagnostic erroné.

9.6.2 Une gélose peut êtreensemencée dès la première étape (§ 9.1) à partir de la première dilution du prélèvement avant incubation. Si des colonies se développent sur cette gélose une réponse positive pourra être anticipée, en revanche l'absence de colonie n'assure pas l'absence de mycoplasmes dans ce prélèvement.

9.6.3 Les prélèvements de lait induisent souvent un trouble des milieux liquides préjudiciable à la lecture visuelle de la croissance, ceci au moins pour les dilutions les plus faibles. Il convient dans ce cas de modifier la procédure dès l'étape 9.3 en procédant à l'aveugle un ensemencement systématiquement sur gélose et au repiquage en bouillon des trois dernières dilutions.

9.6.4 Les milieux commerciaux actuellement disponibles offrent une excellente sensibilité qui, a priori, est très suffisante en routine même pour des prélèvements pauvres en mycoplasmes tels les laits de mélange. Un enrichissement avant inoculation est parfois pratiqué : soit par ensemencement d'une plus grande quantité, 2ml dans 18ml au lieu de 0,2 ml dans 1,8 ml, soit par centrifugation de 30ml à 1000g

pendant 15 mn, soit par pré-incubation du lait pendant 1 à 2 jours après addition d'ampicilline 1 à 10 mg par ml.

9.6.5 Pour certaines espèces de mycoplasmes la viabilité des cultures en bouillon s'altère rapidement après la phase exponentielle de croissance. Ceci peut induire une réponse faussement négative lors de la confirmation par ensemencement sur boîte (§ 9.3.2). Il convient de ne pas laisser trop longtemps les cultures à l'étuve et d'ensemencer les géloses en (§ 9.3.2) prioritairement à partir des dilutions les plus élevées (cultures plus jeunes) si plusieurs dilutions présentent une croissance.

10 – CONDITIONS DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS ET DES SOUCHES

Les prélèvements sont conservés à température inférieure ou égale à -18°C jusqu'à émission du résultat.

Les cultures obtenues sont conservées à température inférieure ou égale à -18°C , les premiers passages positifs en bouillon seront transféré pour l'identification.

Pour une conservation longue, les prélèvements (surtout de lait) et cultures seront conservées à -80°C .

Les cultures sur géloses sont conservées à 4°C hermétiquement fermées sous film plastique jusqu'au transfert pour l'identification.

11 – EXPRESSION DES RESULTATS A TITRE D'EXEMPLE

Recherche de mycoplasmes positive à partir du prélèvement. La culture obtenue a été envoyée à un laboratoire spécialisé pour l'identification.

Recherche de mycoplasmes négative

Recherche de mycoplasmes : résultat ininterprétable (chapitre 12)

12 - FIDELITE

Lors de forte contamination microbienne, la croissance des mycoplasmes peut être inhibée ou masquée.

13 – PROCES VERBAL D'ANALYSE

Il ne diffère pas de celui défini pour tout essai.

14 - ANNEXES

Sans objet.

Annexe 2 : Fiche de prélèvements à réaliser dans le cadre d'une recherche de mycoplasme



PRELEVEMENTS A REALISER DANS LE CADRE D'UNE RECHERCHE DE MYCOPLASME

Affection	Type de prélèvement	Conservation avant envoi et température d'acheminement	Particularités	Technique de prélèvement	
Pneumonie	Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)	+ 4°C (réfrigérants) (2) LBA, ATT, Poumon, Écouvillon nasal (3) Lait	- - Prélever une large portion à la jonction entre parenchyme sain et lésé ou poumon (ou lobe) entier	<i>Bulletin des GTV</i> (2002) n°13, p.83-85	
	Liquide d'Aspiration Trans-Trachéale (ATT)			<i>Bulletin des GTV</i> (2001) n°12, p.13-16	
	Poumon			-	
Mammite	Écouvillon nasal profond (2)	+ 4°C (réfrigérants) (2) LBA, ATT, Poumon, Écouvillon nasal (3) Lait	Prélèvement peu intéressant pour le diagnostic de <i>Mycoplasma</i> Dessiccation rapide de l'écouvillon et contaminations fréquentes	<i>Point Vétérinaire</i> (2007) n°275 p.13	
Arthrite	Lait		Prélèvement individuel par quartiers atteints	Protocole identique aux prélèvements pour la bactériologie	Technique classique de ponction articulaire avec asepsie rigoureuse
	Liquide synovial		Doit être réalisé sur des arthrites aiguës en raison de la disparition rapide des <i>Mycoplasmas</i> dans ce type de lésion (57 jours environ)	-	
Oïte	Articulation (fermée)	+ 4°C (réfrigérants) (2) LBA, ATT, Poumon, Écouvillon nasal (3) Lait	Envoi très rapide au laboratoire car risque de dessiccation	Sur écouvillon classique (tige plastique) Introduire dans le conduit auditif, le plus profondément possible et parallèlement au pavillon auriculaire (comme pour un coton-tige) puis faire quelques rotations avant de le retirer	
	Écouvillon auriculaire		Risque de dessiccation rapide de l'écouvillon (PCR conseillée)	Écouvillonnage de la conjonctive et du cul-de-sac conjonctival	
Kérato-conjunctivite	Écouvillon oculaire	+ 4°C (réfrigérants) (2) LBA, ATT, Poumon, Écouvillon nasal (3) Lait	-	Protocole identique aux prélèvements pour la bactériologie	
Avortement	Foie, avorton, placenta et cotylédon		-	-	
Pathologie génitale	Écouvillon vaginal ou cervical		-	-	

(2) **Écouvillon nasal** : Il ne semble pas être un prélèvement de valeur pour la recherche de *M. bovis* au niveau individuel. Les cultures obtenues par écouvillon nasal ne sont pas représentatives des mycoplasmes présents au niveau de l'appareil respiratoire profond. De plus, il apparaît un manque de sensibilité de l'écouvillon nasal (21,4%) par rapport au lavage broncho-alvéolaire : pour 10 lavages broncho-alvéolaires positifs en *M. bovis*, seuls deux écouvillons nasaux correspondants sont également positifs. (Thomas et coll., (2002) *Veterinary Research Communication*, 26(5) p.333-339)

(3) **LBA, ATT, Poumon, Écouvillon nasal** : Aucune donnée n'est disponible quant à la durée de survie des mycoplasmes pathogènes dans ces prélèvements. Nous conseillons donc d'assurer la conservation de ces échantillons à +4°C et de les acheminer le plus rapidement possible au laboratoire (**c'est-à-dire délai de conservation de 12h à 24h maximum au cabinet et 24h maximum pour l'acheminement au laboratoire** (Chronopost)). Si le délai avant envoi doit dépasser 48h, il est préférable de les congeler à -20°C (excepté si une recherche de pasteurelles est envisagée).

(3) **Lait** : le prélèvement sera conservé à +4°C jusqu'à expédition (acheminer en 24h vers le laboratoire (Chronopost)) ; pour un stockage longue durée il est conseillé de congeler à -80°C.

Annexe 3 : Fiche Technique Méthode de transmission des souches de mycoplasmes vers l'Anses Lyon (afin d'assurer leur conservation pendant le transport)

Échantillons à faire parvenir à l'Anses site de Lyon

- Prioritairement, une boîte de gélose avec des colonies de mycoplasmes
- Un tube de 2 ml environ de culture en bouillon (hermétiquement fermé). Il peut s'agir du tube ayant servi à l'ensemencement des géloses et conservé congelé.

Modalités d'envoi

- Joindre la fiche de commémoratifs VIGIMYC.
- Envoyer sous couvert du froid (4°C).
- Les prélèvements doivent être conditionnés selon les recommandations d'usage définies pour l'expédition des matériaux biologiques contaminés et parfaitement identifiés.

Adresse

Anses Lyon
VIGIMYC
31, avenue Tony Garnier
69364 LYON cedex 07

Remarques

Le double échantillonnage est nécessaire pour assurer à la fois une identification rapide et la mise en collection.

La gélose permet une excellente conservation des mycoplasmes pendant le transport. A l'arrivée à l'Anses Lyon, des colonies sont repiquées en bouillon à partir de cette gélose. L'identification est réalisée sur les cultures obtenues et la souche est lyophilisée pour être mise en collection si elle présente un intérêt épidémiologique.

Les cultures en bouillon se conservent mal et souvent il est difficile de redémarrer la souche pour identification et mise en collection. En revanche l'identification est réalisable directement sur ce tube permettant d'anticiper la réponse de quelques jours. Les deux types d'échantillons sont donc nécessaires.



Fiche VIGIMYC

A retourner à :
UMR « Mycoplasmoses des ruminants »
Anses Lyon - 31 avenue Tony GARNIER –
69364 Lyon Cedex 07
télécopie : 04 78 61 91 45
Courriel : Vigimyc@anses.fr

△ Une seule fiche VIGIMYC par animal

REFERENCES DU LABORATOIRE D'ANALYSE

Nom, adresse, téléphone, télécopie

REFERENCES DE L'ANSES

Cadre réservé à l'Anses

ORIGINE ET CONTEXTE DU PRELEVEMENT	
■ Date de prélèvement :	<input type="text"/>
■ Code Postal	<input type="text"/>
■ Commune	<input type="text"/>
■ Autres animaux de cet élevage transmis ce jour	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> oui
■ Prélèvements de cet élevage transmis dans les 30 jours précédents	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> oui
ANIMAL	
■ Espèce animale	<input type="checkbox"/> Bovin <input type="checkbox"/> Ovin <input type="checkbox"/> Caprin
<input type="checkbox"/> Autre (préciser)	<input type="text"/>
■ Classe d'âge	<input type="checkbox"/> Adulte
	<input type="checkbox"/> Jeune non sevré
	<input type="checkbox"/> Jeune sevré
	<input type="checkbox"/> Jeune sans précision
	<input type="checkbox"/> Ne sais pas
■ Type production :	<input type="checkbox"/> lait <input type="checkbox"/> Viande
	<input type="checkbox"/> Ne sait pas
■ Type élevage :	<input type="checkbox"/> Naisseur <input type="checkbox"/> Engaisseur
	<input type="checkbox"/> Naisseur/engaisseur <input type="checkbox"/> Ne sais pas
■ Symptômes	<input type="checkbox"/> Pathologie respiratoire <input type="checkbox"/> Arthrite
	<input type="checkbox"/> Kérato-conjonctivite <input type="checkbox"/> Mammite
	<input type="checkbox"/> Septicémie <input type="checkbox"/> Otite
	<input type="checkbox"/> Avortement <input type="checkbox"/> Aucune pathologie (et suivi sanitaire)
	<input type="checkbox"/> Ne sait pas
	<input type="checkbox"/> Autre (préciser) <input type="text"/>

PRELEVEMENT n°1	
■ N° prélèvement (référence laboratoire)	<input type="text"/>
■ Nature du prélèvement	<input type="checkbox"/> Lait individuel
	<input type="checkbox"/> Lait de tank
	<input type="checkbox"/> Parenchyme pulmonaire
	<input type="checkbox"/> Lavage broncho-alvéolaire/trans trachéal
	<input type="checkbox"/> Articulation
	<input type="checkbox"/> Liquide synovial
	<input type="checkbox"/> Ecouvillon nasal
	<input type="checkbox"/> Ecouvillon oculaire
	<input type="checkbox"/> Ecouvillon auriculaire
	<input type="checkbox"/> Ecouvillon génital
	<input type="checkbox"/> Autre (préciser) <input type="text"/>
■ Résultats : mycoplasmes	
* à remplir pour l'enquête mycoplasmoses respiratoires des bovines	
<input type="checkbox"/> * Pas de recherche spécifique	
<input type="checkbox"/> * Non, aucun mycoplasme isolé	Faxer la fiche au : 04 78 61 91 45
<input type="checkbox"/> Oui, présence de mycoplasmes	Envoyer à Lyon pour identification
	Si non préciser <input type="text"/>
	l'espèce identifiée <input type="text"/>
■ Résultats : autres bactéries isolées	
<input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> Ne sais pas	
Préciser :	<input type="text"/>
■ Résultats : virus associés (si possible)	
<input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non fait <input type="checkbox"/> Ne sais pas	
Préciser :	<input type="text"/>

Si plusieurs prélèvements sur le même animal renseigner la page 2

Annexe 5 : Lettre d'accompagnement de l'autoquestionnaire envoyé aux laboratoires vétérinaires français

ADRESSE LABO

A Lyon, le 23 mai 2012

Madame, Monsieur,

Le réseau national d'épidémiologie des mycoplasmoses des ruminants, VIGIMYC, créée en 2003, a pour but de promouvoir le diagnostic et de surveiller l'évolution des mycoplasmoses de ruminants. Il permet également de constituer, à des fins d'expertise et de recherche, une collection de souches représentatives de la situation épidémiologique nationale.

Aujourd'hui, avec la prise en charge directe par les laboratoires, notamment par des techniques de PCR, de l'identification de certains mycoplasmes, le diagnostic des mycoplasmoses des ruminants entre dans une phase de mutation qui risque de remettre en cause le principe de base du réseau. Notre laboratoire, en tant qu'animateur de VIGIMYC, souhaiterait mieux appréhender l'ampleur et l'immédiateté de cette mutation pour proposer dès que possible une nouvelle méthodologie de surveillance. C'est l'objet du questionnaire joint.

Tous les laboratoires d'analyses vétérinaires identifiés en France et traitant les prélèvements de ruminants sont sollicités, qu'ils soient membres ou non du réseau VIGIMYC. Les données de cette étude seront analysées de manière globale et totalement anonyme. Les résultats vous seront communiqués par courriel (**merci de nous préciser votre e-mail: _____**), dans la mesure où vous aurez participé à l'enquête. Les informations recueillies par ce questionnaire feront l'objet d'un traitement informatisé. Vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent.

Vous trouverez ci-joint une enveloppe pré-affranchie et pré-adressée pour nous faire parvenir votre questionnaire **avant le 14 juillet 2012**

Ce questionnaire est le premier volet d'une thèse vétérinaire (VetAgroSup) réalisée par **Sandrine Bonnet** et dont l'objectif principal est l'analyse des apports de la PCR en temps réel (rtPCR) pour le diagnostic des mycoplasmoses de ruminants.

Nous vous remercions par avance de votre contribution à cette étude.

F. Poumarat pour l'équipe VIGIMYC
Anses, Laboratoire de Lyon
Unité Mycoplasmiologie
31
F-69364

avenue
Lyon



Annexe 6 : Autoquestionnaire envoyé aux laboratoires vétérinaires français

I. Combien votre laboratoire a-t-il traité de prélèvements pour analyse bactériologique et/ou mycoplasmique en 2011 ?

	Bovins	Ovins	Caprins	Autres ruminants	Autres filières (porc, volaille...)
Analyses bactériologiques	<input type="checkbox"/> < 50 <input type="checkbox"/> 50-100 <input type="checkbox"/> >100	<input type="checkbox"/> < 50 <input type="checkbox"/> 50-100 <input type="checkbox"/> > 100	<input type="checkbox"/> < 50 <input type="checkbox"/> 50-100 <input type="checkbox"/> > 100	<input type="checkbox"/> < 50 <input type="checkbox"/> 50-100 <input type="checkbox"/> >100	<input type="checkbox"/> < 50 <input type="checkbox"/> 50-100 <input type="checkbox"/> >100
Analyses mycoplasmiques	<input type="checkbox"/> < 10 <input type="checkbox"/> 10-50 <input type="checkbox"/> >50	<input type="checkbox"/> < 10 <input type="checkbox"/> 10-50 <input type="checkbox"/> >50	<input type="checkbox"/> < 10 <input type="checkbox"/> 10-50 <input type="checkbox"/> >50	<input type="checkbox"/> < 10 <input type="checkbox"/> 10-50 <input type="checkbox"/> >50	<input type="checkbox"/> < 10 <input type="checkbox"/> 10-50 <input type="checkbox"/> >50

II. De quel type de thermocycleur êtes-vous équipé pour effectuer des PCR ?

- PCR classique rtPCR Pas d'appareil

III. En ce qui concerne vos analyses pour la recherche de mycoplasmes de ruminants :

- Vous ne recevez pas de demandes
 Vous sous-traitez les demandes à un autre laboratoire.
 Vous réalisez ces analyses par culture en milieu spécifique puis envoi pour identification à VIGIMYC Non Oui

- Vous répondez à des demandes spécifiques en utilisant exclusivement des analyses de PCR ou rtPCR
 Autre. Précisez
-

IV. Concernant les mycoplasmes de ruminants, vos rendus de résultats aux vétérinaires sont plutôt :

- Une pré-réponse sous forme « Présence/Absence » suivie plus tard d'une précision quant à l'espèce isolée
 Une réponse unique précisant l'espèce

V. Le passage à une technique d'analyse directe par rtPCR pour le diagnostic de certaines espèces de mycoplasmes de ruminants présenterait-il un intérêt pour vous ?

- Oui. Pourquoi ?** (à classer de 1 à 4 ou 5 ; 1 très important, 4 ou 5 mineur)

- Délais de réponse
 Analyse plus complète / précise (identification et quantification)
 Possibilité d'effectuer un plus grand nombre d'analyses simultanément
 Prix de revient par analyse
 Autre. Précisez
-

- Non. Pourquoi ?** (à classer de 1 à 3 ou 4 ; 1 très important, 3 ou 4 mineur)

- Prix du thermocycleur
 Prix de revient des réactifs ou kits de rtPCR
 Trop peu de prélèvements à analyser

Autre. Précisez

VI. Comment définiriez-vous l'évolution de vos activités diagnostiques pour les mycoplasmoses dans les années à venir ?

Pour les ruminants : stable en augmentation en déclin

Autres filières : stable en augmentation en déclin

Commentaires :

NB : si vous souhaitez de plus amples informations par rapport à VIGIMYC, merci de nous adresser un mail à vigimyc@anses.fr.

Annexe 7 : Liste des laboratoires d'analyses vétérinaires français

Laboratoires	Adresses	Compléments d'adresse	Boîtes Postales	Codes postaux	Communes	Filières B : bovine A : avicole P : porcine	Numéros de téléphone	Numéros de fax
AA BIO VET	Centre d'Activités	29, quai du Haut Pont		62500	St OMER		03 21 93 44 63	03 21 98 70 82
ALCYON	ZI de Kériel-Plouédern		BP 109	29411	LANDERNEAU CEDEX	AP	02 98 85 46 23	02 98 85 46 05
ANIBIO	19, rue de la ferrière			56930	PLUMELIAU	AP	02 97 51 93 00	02 97 51 87 51
BIO-CHENE VERT	ZI Bellevue II	Rue Blaise Pascal	BP 82101	35221	CHATEAUBOURG CEDEX	AP	02 99 00 33 43	02 99 62 30 65
BIOLAB33	12 avenue Pasteur			33185	LE HAILLAN		05 56 13 08 40	05 56 13 08 41
BIOVILAINE	Z.A. des Chapelets	87 Rue de la Chataigneraie		35600	REDON	BA	02 99 71 39 39	02 99 72 35 08
COOPHAVET	Saint Herblon		BP 70089	44153	ANCENIS CEDEX		02 40 98 02 16	02 40 98 03 99
DELTA VIT	Parc d'activités Nord-Est du Bois de Teillay			35150	JANZÉ	AP	02 99 47 53 19	02 99 47 53 44
LABOFARM	4, rue Théodore Botrel		BP 351	22603	LOUDEAC CEDEX	BAP	02 96 28 63 43	02 96 66 08 88
Laboratoire Cebiphar	1, rue de la Bodinière			37230	FONDETTES		02 47 42 48 48	02 47 42 03 28
Laboratoire des Sources	Blvd de la Cote du Nord			35133	LECOUSSE	AP	02 99 94 54 45	02 99 94 02 19
Laboratoire G. Meynaud	Centre Commercial des Roses			31240	St JEAN		05 61 22 46 50	09 61 30 80 49
Laboratoire HGRTS Pays de Loire	Rue St Eloi	ZA de la Douarderie		49290	St LAURENT DE LA PLAINE	A	02 41 66 12 20	02 41 66 12 29
Laboratoire Omega Pharma France	20, rue André Gide		BP 80	92321	CHATILLON CEDEX		01 55 48 18 00	01 55 48 18 55
Laboratoire Vétérinaire INZO	Rue de l'Eglise		BP 50019	2407	CHIERRY CEDEX	BAP	SZ:03 23 84 80 87, SU:03 23 84 80 85	03 23 84 86 43
LABOVET	ZAC de la Buzenière		BP 539	85500	LES HERBIERS	AP	02 51 91 29 05	02 51 66 82 29
LBAA	ZI allée du Lyonnais			26300	BOURG DE PEAGE	A	04 75 72 73 19	04 75 72 27 39
Laboratoire VEBIOTEL	41 bis avenue Aristide Briand			94117	ARCUEIL CEDEX	Cn	01 49 12 11 02	01 49 12 11 10
Service des Laboratoires Officiels Vétérinaire Agroalimentaire & Phyto-sanitaire	LNC	Site de Port Laguerre	BP 42	98890	PAÏTA NOUVELLE CALEDONIE		00 687 35 31 34	00 687 35 30 40
LDA 01	Site Santé animale, Chemin de la Mîche	CENORD		O1000	BOURG EN BRESSE	BAP	04 74 45 58 00	04 74 23 60 35
Laboratoire Départemental de Diagnostic Vétérinaire	180, rue Pierre-Gilles de Gennes	ZA du Griffon - Barenton-Bugny		02007	LAON CEDEX		03 23 23 64 70	03 23 23 64 98
IPL Laboratoire d'Analyses de l'Allier	Zone de l'Etoile	Boulevard de Nomazy	BP 1707	03017	MOULINS CEDEX	BAP	04 70 47 71 00	04 70 47 71 29
Laboratoire Vétérinaire Départemental	Quartier St Christophe		BP 9007	04990	DIGNE LES BAINS CEDEX	BAP	04 92 32 39 33	04 92 32 62 68
Laboratoire Départemental Vétérinaire et Hygiène Alimentaire	5, rue des Silos		BP 63	05002	GAP CEDEX		04 92 52 44 44	04 92 51 92 40
Laboratoire Vétérinaire Départemental	105, route des Chappes	Quartier des templiers	BP 107	06902	SOPHIA ANTIPOLIS CEDEX	Chiens	04 92 96 00 00	04 92 96 01 20
Laboratoire Départemental d'Analyses			BP 2	08430	HAGNICOURT		03 24 59 61 53	03 24 72 67 57
Laboratoire Vétérinaire Départemental	Rue Las Escoumes			09008	FOIX CEDEX CDIS		05 61 55 07 21	05 61 03 58 01
Laboratoire d'Analyses Vétérinaires	Chemin des champs de la Loge		BP 216	10006	TROYES CEDEX	B	03 25 42 52 00	03 25 42 52 15
Laboratoire vétérinaire départemental D.I.D	Allée Raymond Courrière			11000	CARCASSONNE CEDEX 9		04 68 11 67 54	04 68 11 67 58
Aveyron labo	ZA Bel Air Rue des Artisans		BP 3118	12031	RODEZ CEDEX 9	B	05 65 76 51 30	05 65 76 51 31
Laboratoire départemental d'analyses	29 rue Joliot Curie	technopole de Château-Gombert		13013	MARSEILLE	A	04 91 10 90 00	04 91 10 90 96
Laboratoire départemental Frank Duncombe	1, route de Rosel			14280	SAINT CONTEST		02 31 47 19 19	02 31 47 19 00
Laboratoire départemental d'analyses et de recherche (LDAR)	100, rue de l'Egalité			15013	AURILLAC CEDEX	B	04 71 45 58 80	04 71 45 58 89

Laboratoire départemental d'analyses de la Charente	496, Route de Bordeaux			16021	ANGOULEME CEDEX	BAP	05 45 91 91 91	05 45 91 56 16
Laboratoire départemental d'analyses	216, rue Louis Mallet			18020	BOURGES Cedex		02 48 21 15 31	02 48 50 62 82
Laboratoire départemental d'analyses	Le Treuil		BP 202	19012	TULLE CEDEX	B	05 55 26 77 00	05 55 26 09 20
Laboratoire départemental d'analyses vétérinaires agricoles et des eaux	22 Rue François Pietri		BP 60969	20700	AJACCIO CEDEX 09		04 95 29 14 80	04 95 29 14 57
Laboratoire départemental d'analyses	Maison du Parc Erbajolo			20200	BASTIA		04 95 30 94 80	04 95 30 94 84
Laboratoire départemental de la Côte d'Or	2 ter, rue Hoche		BP 71778	21017	DIJON Cedex		03 80 63 67 70	03 80 43 54 52
Laboratoire de développement et d'analyses des Côtes-d'Armor	5-7 Rue du Sabot		BP 54	22440	PLOUFRAGAN	BAP	02 96 01 37 22	02 96 01 37 50
Laboratoire départemental d'analyses	42-44, route de Guéret		BP 3	23380	AJAIN		05 55 81 87 30	05 55 81 87 40
Laboratoire départemental d'analyse et de Recherche	161 Avenue Winston Churchill			24660	COULOUNIEUX CHAMERS		05 53 06 80 00	05 53 09 88 22
Laboratoire vétérinaire départemental	13, rue Gay Lussac		BP 1981	25020	BESANCON CEDEX		03 81 25 88 50	03 81 25 88 51
Laboratoire départemental d'analyses de la Drôme	Parc d'Affaires de Lautagne	37, avenue de Lautagne	BP 118	26904	VALENCE CEDEX 9		04 75 81 70 70	04 75 81 70 71
Laboratoire départemental d'analyses	12, rue du Dr Michel Baudoux			27023	EVREUX CEDEX		02 32 38 26 70	02 32 38 65 19
Laboratoire départemental d'analyses	49, rue des Chaises			28000	CHARTRES		02 37 28 56 56	02 37 91 08 04
IDHESA Bretagne Océane 29	22 av de la plage des Guerres	ZA de Créach Gwen		29334	QUIMPER CEDEX	BAP	02 98 10 28 88	02 98 10 28 60
Laboratoire départemental d'analyses	970 route de St Gilles		BP 50015	30942	NIMES CEDEX 1	BAP	04 66 04 30 70	04 66 04 30 90
Laboratoire vétérinaire départemental	76 Chemin Boudou		CS 50013	31140	LAUNAGUET		05 62 79 94 20	05 62 79 94 30
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	23 chemin Capelles			31300	TOULOUSE			
Laboratoire départemental vétérinaire et des eaux	Chemin de Naréoux			32020	AUCH CEDEX 09	BA	05 42 54 02 00	05 42 54 02 01
Laboratoire Vétérinaire Départemental - LABSA	33 Avenue du Dr Schweitzer			33068	PESSAC CEDEX	BA	05 57 35 01 90	05 57 35 01 91
Laboratoire départemental vétérinaire	306, rue de Croix Las Cazes		CS 69013	34967	MONTPELLIER Cedex 2		04 67 10 17 17	04 67 54 32 02
Institut en Santé Agro Environnement	24, rue Antoine Joly		BP 3163	35031	RENNES CEDEX	BAP	02 99 14 27 00	02 99 14 27 01
Laboratoire départemental d'Analyses	Boulevard George Sand	Cité Administrative	BP 502	36018	CHATEAUROUX Cedex	B	02 54 22 01 85	02 54 07 17 90
Laboratoire de Touraine			BP 67357	37073	TOURS CEDEX 2	BAP	02 47 29 44 47	02 47 29 44 00
Laboratoire vétérinaire départemental	20, avenue Saint-Roch			38000	GRENOBLE	B	04 76 03 75 40	04 76 03 75 50
Laboratoire départemental	59 Rue du vieil hôpital		BP 40135	39802	POLIGNY CEDEX 2	B	03 84 73 73 40	03 84 37 12 14

Laboratoire Départemental des Landes	1, rue Marcel David		BP 219	40004	MONT-DE-MARSAN CEDEX	A	05 58 06 08 08	05 58 06 15 47
Laboratoire vétérinaire départemental	ZI de Vaure	Avenue Louis Lépine	BP 207	42605	MONTBRISON CEDEX	BAP	04 77 58 28 05	04 77 58 00 40
Laboratoire départemental d'analyses	16, rue de Vienne		BP 81	43003	LE PUY- EN -VELAY Cedex		04 71 05 76 76	04 71 02 52 13
ONIRIS 44 (ENV)	Atlantpôle la Chanterrie		BP 40706	44307	NANTES CEDEX03		02,40,68,77,77	02,40,68,77,78
Institut départemental d'analyse et de conseil - IDAC	Route de Gachet		BP 52703	44327	NANTES CEDEX03	B	02 51 85 44 44	02 51 85 44 54
Laboratoire d'analyses départemental	Avenue de l' Europe	Regourd	BP 295	46005	CAHORS		05 65 53 45 01	05 65 53 45 29
Laboratoire des Pyrénées - Site d' Agen	8, rue René Cassin			47000	AGEN		05 53 77 04 19	05 53 98 15 01
Laboratoire départemental d'analyses	Rue du Gévaudan		BP 143	48005	MENDE CEDEX	B	04 66 65 72 10	04 66 65 72 14
Anjou Laboratoire	18, Blvd Lavoisier	Square Emile Roux	BP 20943	49009	ANGERS CEDEX01		02 41 22 68 00	02 41 22 68 10
Laboratoire départemental d'analyses	1352 Avenue de Paris			50008	SAINT LO CEDEX	B	02 33 75 63 00	02 33 75 63 01
Laboratoire départemental d'analyses vétérinaires et alimentaires	Rue du Lycée Agricole	CHOIGNES	BP 2033	52000	CHAMARANDES		03 25 30 31 70	03 25 30 31 79
Laboratoire vétérinaire départemental	224, Rue du Bas des Bois		BP 1427	53014	LAVAL CEDEX	BAP	02 43 56 36 81	02 43 49 07 99
Laboratoire vétérinaire et alimentaire	Domaine de Pixérécourt		BP 60029	54220	MALZEVILLE	BAP	03 83 33 28 60	03 83 21 52 46
LVD 55 - SEGILAB	Chemin des romains			55000	BAR LE DUC	B	03 29 79 96 01	03 29 79 96 20
Laboratoire Départemental d'Analyses	5 rue Denis papin		BP 20080	56892	SAINT AVE CEDEX		02 97 46 68 86	02 97 46 68 79
Laboratoire Central d'Analyses de la Moselle	7 rue de l'Abbé Gregoire		CS 52083	57052	METZ CEDEX 3	BAP	03 87 37 40 60	03 87 36 74 80
Service du Laboratoire départemental	Rue de la Fosse aux Loups		BP 25	58028	NEVERS CEDEX	B	03 86 71 93 60	03 86 36 72 67
Laboratoire départemental public	Domaine du CERTIA	369, rue Jules Guesde	BP 20039	59651	VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX		03 20 67 15 16	03 20 67 10 01
Laboratoire départemental d'analyses de l'Oise	14, rue Albert et Arthur Desjardins		BP 457	60004	BEAUVAIS CEDEX		03 44 06 62 78	03 44 06 60 36
Laboratoire départemental de l'Orne	19 Rue Candie		BP 7	61001	ALENCON CEDEX	B	02 33 82 39 00	02 33 26 55 61
Laboratoire départemental d'analyses	Parc de haute technologie des Bonnettes	2, rue du Génévrier		62022	ARRAS CEDEX		03 21 51 46 54	03 21 71 48 55
Laboratoire vétérinaire et biologique	20 rue Aimé Rudel		BP 42	63370	LEMPDES		04 73 90 10 41	04 73 91 61 04
Laboratoire des Pyrénées - Site de Lagor	Rue des Ecoles			64150	LAGOR		05 59 60 23 85	05 59 60 74 47
Laboratoire des Pyrénées	Centre Kennedy	Bd Kennedy		65025	TARBES CEDEX		05 62 56 71 65	05 62 56 71 66
Centre d'analyses Méditerranée-Pyrénées	Tecnosud	Rambla de la Thermodynamique		66100	PERPIGNAN		04 68 68 33 00	04 68 56 49 05
Laboratoire départemental d'analyses	2 place de l'abattoir			67200	STRASBOURG	BAP	03 90 20 65 20	03 90 20 65 36
Laboratoire vétérinaire départemental	4, allée de Herrlisheim		CS 60030	68025	COLMAR Cedex		03 89 30 10 40	03 89 21 64 46
Laboratoire départemental vétérinaire	Vetagro Sup - Campus vétérinaire	1, avenue Bourgelat		69280	MARCY L'ETOILE		04 78 87 82 04	04 78 87 82 08

Laboratoire départemental vétérinaire et d'hydrologie	29, rue La Fayette		BP 296	70006	VESOUL CEDEX		03 84 95 77 70	03 84 95 77 71
Laboratoire départemental d'analyses	267, rue des Epinoches			71000	MACON	BAP	03 85 33 52 20	03 85 33 52 25
Laboratoire départemental de la Sarthe	128, rue de Beaugé			72018	LE MANS CEDEX 2		02 43 39 95 70	02 43 39 95 80
Laboratoire départemental d'analyses vétérinaires	321, chemin des Moulins			73024	CHAMBERY Cedex		04 79 33 19 27	04 79 60 58 20
Lidal - laboratoire vétérinaire départemental	22 rue du Pré Fomet		BP 42	74602	SEYNOD CEDEX	B	04 50 45 82 56	04 50 45 63 31
Laboratoire agro vétérinaire départemental	Avenue du Grand Cours		BP 1140	76175	ROUEN CEDEX 1	BAP	02 35 03 50 00	02 35 03 50 15
Laboratoire Départemental d'Analyses	145, Quai Voltaire			77190	DAMMARIÉ LES LYS		01 64 14 76 56	01 64 14 76 66
IPL Santé, Environnement Durables Ile de France	56, avenue de St Cloud			78000	VERSAILLES		01 39 07 78 35	01 39 07 89 44
Laboratoire d'Analyses Sèvres Atlantique	210 Avenue de la Venise Verte			79000	NIORT		05 49 17 10 57	05 49 09 08 70
V.T. BIO	47 Rue du Poitou		BP 24	79130	SECONDIGNY		05,49,63,50,21	05,49,63,29,54
LABO 79	Avenue de la Promenade			79140	CERIZAY		05,49,80,89,85	05,49,80,16,28
Laboratoire vétérinaire départemental	31, avenue Paul Claudel			80480	DURY		03 22 71 97 80	03 22 71 97 99
Laboratoire Départemental d'Analyses	Z.A. Albitech	32, rue Gustave Eiffel		81011	ALBI CEDEX 09		05 63 47 57 75	05 63 46 07 38
Laboratoire vétérinaire départemental	60 av Marcel Unal		BP 747	82013	MONTAUBAN CEDEX		05 63 66 71 71	05 63 66 63 27
Laboratoire départemental d'analyses du Var	375, rue Jean Aicard		BP 263	83007	DRAGUIGNAN CEDEX		04 94 60 44 00	04 94 67 49 11
Laboratoire départemental d'analyses	285, Rue Raoul Follereau		BP 852	84082	AVIGNON CEDEX 2	A	04 90 16 41 00	04 90 89 68 90
Laboratoire de l'Environnement et de l'Alimentation de la Vendée	Rond point Georges Duval		BP 802	85021	LA ROCHE SUR YON CEDEX	BAP	02 51 24 51 51	02 51 24 51 50
Laboratoire d'analyses Sèvres Atlantique - LASAT	39, rue de Beaulieu			86034	POITIERS CEDEX		05 49 61 23 23	05 49 61 29 25
Laboratoire vétérinaire départemental	Avenue du Professeur J. Léobardy		BP 50165	87005	LIMOGES		05 55 34 40 12	05 55 33 78 15
Laboratoire vétérinaire départemental	48, rue de la Bazaine		BP 1027	88050	EPINAL CEDEX 09		03 29 38 21 40	03 29 38 21 49
Institut départemental de l'environnement et d'analyses - IDEA	10, av du 4ème RI		BP 9002	89011	AUXERRE CEDEX		03 86 34 61 00	03 86 34 61 01
Laboratoire d'Analyses Vétérinaires de l'Arche	129, rue de la République			92800	PUTEAUX		01 49 01 93 13	01 49 01 06 90
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	7, av. du Général de Gaulle			94704	MAISONS ALFORT CEDEX		01 43 96 71 28	01 43 96 71 25
Laboratoire Départemental d'Analyses	35, boulevard Pasteur		BP 628	97261	FORT DE France CEDEX		05 96 71 24 68	05 96 70 61 23
Laboratoire Vétérinaire Départemental 974	14, rue du Stade de l'Est	Commune Primat		97490	SAINTE CLOTILDE		02 62 28 02 82	02 62 29 85 17

Annexe 8 : Caractéristiques générales du groupe « Mycoplasmes »

Questions	Filières	Modalités	%	IC	n	
Volume d'analyses pour l'année 2011	Filière bovine	Moins de 50 analyses bactériologiques	10	[3 ; 24]	4	
		Entre 50 et 100 analyses bactériologiques	18	[7 ; 33]	7	
		Plus de 100 analyses bactériologiques	72	[55 ; 85]	28	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				39
		Moins de 10 analyses mycoplasmiques	35	[21 ; 52]	14	
		Entre 10 et 50 analyses mycoplasmiques	45	[29 ; 61]	18	
		Plus de 50 analyses mycoplasmiques	20	[34 ; 66]	8	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				40
	Filière ovine	Moins de 50 analyses bactériologiques	59	[42 ; 74]	23	
		Entre 50 et 100 analyses bactériologiques	18	[7 ; 33]	7	
		Plus de 100 analyses bactériologiques	23	[11 ; 39]	9	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				39
		Moins de 10 analyses mycoplasmiques	76	[60 ; 89]	29	
		Entre 10 et 50 analyses mycoplasmiques	24	[11 ; 40]	9	
		Plus de 50 analyses mycoplasmiques	0	[0 ; 9]	0	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				38
	Filière caprine	Moins de 50 analyses bactériologiques	62	[45 ; 77]	24	
		Entre 50 et 100 analyses bactériologiques	31	[17 ; 48]	12	
		Plus de 100 analyses bactériologiques	8	[2 ; 21]	3	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				39
		Moins de 10 analyses mycoplasmiques	65	[47 ; 80]	24	
		Entre 10 et 50 analyses mycoplasmiques	30	[16 ; 47]	11	
		Plus de 50 analyses mycoplasmiques	5	[1 ; 18]	2	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				37
	Filière autres ruminants	Moins de 50 analyses bactériologiques	91	[75 ; 98]	29	
		Entre 50 et 100 analyses bactériologiques	6	[1 ; 21]	2	
		Plus de 100 analyses bactériologiques	3	[0 ; 16]	1	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				32
		Moins de 10 analyses mycoplasmiques	97	[84 ; 100]	31	
		Entre 10 et 50 analyses mycoplasmiques	0	[0 ; 11]	0	
		Plus de 50 analyses mycoplasmiques	3	[2 ; 25]	1	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				32

	Autres filières	Moins de 50 analyses bactériologiques	43	[26 ; 61]	15	
		Entre 50 et 100 analyses bactériologiques	11	[17 ; 49]	4	
		Plus de 100 analyses bactériologiques	46	[29 ; 63]	16	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				35
		Moins de 10 analyses mycoplasmiques	88	[71 ; 96]	28	
		Entre 10 et 50 analyses mycoplasmiques	3	[0 ; 16]	1	
		Plus de 50 analyses mycoplasmiques	9	[2 ; 25]	3	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				32
Equipement en thermocycleur		Pas de thermocycleur	8	[2 ; 20]	3	
		rtPCR	55	[38 ; 71]	22	
		PCR	3	[0 ; 13]	1	
		PCR et rtPCR	35	[21 ; 52]	14	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				40
Méthodes d'analyses mycoplasmiques		Sous-traitées	3	[0 ; 13]	1	
		Culture	73	[56 ; 85]	29	
		PCR ou rtPCR	5	[1 ; 17]	2	
		Culture pour les petits ruminants et PCR pour les bovins	15	[6 ; 30]	6	
		Critères biochimiques	3	[0 ; 13]	1	
		Sérologie	3	[0 ; 13]	1	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				40
Envoi à Vigimyc		Oui	20	[8 ; 37]	7	
		Non	80	[63 ; 92]	28	
		<i>Nombre de laboratoires réalisant les analyses par culture</i>				35
Rendus des résultats		"Présence-absence"	8	[2 ; 21]	3	
		Pré-réponse puis précision de l'espèce	76	[60 ; 89]	29	
		Réponse unique précisant l'espèce	13	[4 ; 28]	5	
		Réponse unique précisant l'espèce pour bovins et pré-réponse puis précision de l'espèce pour petits ruminants	3	[0 ; 14]	1	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				38
Intérêt pour la rtPCR		Pour	45	[29 ; 61]	18	
		Contre	25	[13 ; 41]	10	
		Pour et contre	30	[17 ; 46]	12	
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>				40

Avantages de la rtPCR		Délai de réponse	83	[65 ; 94]	25
		Analyse plus complète/précise	83	[65 ; 94]	25
		Plus grand nombre d'analyses simultanément	53	[34 ; 72]	16
		Prix de revient par analyse	50	[31 ; 69]	15
		Praticité du transport et de l'analyse	3	[0 ; 17]	1
		Qualité du rendu d'analyses	7	[1 ; 22]	2
		<i>Nombre de laboratoires pour ou pour et contre la rtPCR</i>			
Inconvénients de la rtPCR		Prix du thermocycleur	14	[3 ; 35]	3
		Prix de revient des réactifs ou kits de rtPCR	55	[32 ; 76]	12
		Trop peu de prélèvements à analyser	91	[71 ; 99]	20
		Trop restreint, sans isolement de la souche	18	[5 ; 40]	4
		Autre technique satisfaisante	5	[0 ; 23]	1
		<i>Nombre de laboratoires pour ou pour et contre la rtPCR</i>			
Evolution des activités diagnostiques pour les mycoplasmoses	Ruminants	Stable	68	[50 ; 82]	25
		En augmentation	30	[16 ; 47]	11
		En diminution	3	[0 ; 14]	1
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>			
	Autres filières	Stable	85	[65 ; 96]	22
		En augmentation	8	[1 ; 25]	2
		En diminution	8	[1 ; 25]	2
		<i>Nombre de laboratoires dont on a la réponse</i>			

Tableau de l'analyse des données brutes du groupe « Mycoplasmes ». Il représente le pourcentage de laboratoires avec son intervalle de confiance et le nombre de laboratoires correspondants pour chacune des modalités de réponses de chaque question du questionnaire. Les réponses manquantes n'ont pas été prises en compte d'où des sous-totaux, appelés « Nombre de laboratoires dont on a la réponse », différents de 40. %, pourcentage de laboratoires ; IC, Intervalle de Confiance du pourcentage, calculé à partir du logiciel Swog [102] ; n, nombre de laboratoires concernés.

Annexe 9 : Grille de paiement du lait de la laiterie de l'élevage suivi de 2012 (en €/tonne de lait)

Prix de base 2012

	2011		2012
janvier	647		647
février	589	-6	583
mars	524	-6	518
avril	455		455
mai	455		455
juin	455		455
juillet	446		446
août	484		484
septembre	516		516
octobre	626		626
novembre	646		646
décembre	651		651
Total	524 €	-1 €	523 €

Annexe 10 : Résultats d'analyse du suivi de l'élevage caprin de Rhône-Alpes

N° de travail	N° Lot	Anamnèse	Traitement	Prélèvements le 18/05/12					Prélèvements le 29/11/12					
				rtPCR OD	MF-dot OD	rtPCR OG	MF-dot OG	rtPCR Lait	Mfdot LAIT	Traitement tarissement	N° Lot	Réforme ou mort	rtPCR Lait	
901	3	SAINE											R 20/07	
906	1	SAINE						-					2	
909													3	
912	3	SAINE												R 20/07
913	3	SAINE						+		spéciorlac + tylan	4			-
919													3	
922													3	
924	1	SAINE		+	Pas de croissance			-					4	
928													4	
933	3	SAINE						+					3	
942	3	SAINE						+					3	
945	3	SAINE						+					4	
950	3	SAINE						+					3	
953	1	SAINE						+					4	
954	3	SAINE						+					3	
957	1	SAINE						-					4	
960	3	SAINE		+	Pas de croissance			-	Mcc					R 20/07
961													4	
962	3	SAINE												R 20/07
963													3	
964	3	bipare guérie qui a eu des rechutes	2 traitements au Tylan (2X pdt 10j)	-				+						R 20/07
968	3	SAINE						-					3	
972													3	
973	3	SAINE		+	Pas de croissance			+	Mcc				2	
975	3	SAINE						+					4	
980	3	SAINE						-		spéciorlac + tylan	3			
981	3	SAINE		-	Pas de croissance			+	Mcc				3	
982	3	SAINE		+	Pas de croissance			-	Pas de croissance				3	
983	3	SAINE												R 20/07
988													4	
988	3	SAINE		+	Mmc			+	Pas de croissance				3	
992	3	SAINE		+	Pas de croissance			-	Mcc				3	
993	3	SAINE						-					2	
994	3	SAINE						-		spéciorlac + tylan	2			
4401	3	SAINE												R 20/07
4451	3	SAINE						-					4	
5422	3	SAINE		-	Pas de croissance			-	Mcc					R 20/07
5436													3	
5452	3	SAINE		+	Pas de croissance			+	Pas de croissance					R 20/07
5459													3	
11002	1	SAINE						-					4	+
11003	1	SAINE		+	Mmc			-					4	

		Prélèvements le 18/05/12								Prélèvements le 29/11/12			
N° de travail	N° Lot	Anamnèse	Traitement	rtPCR OD	MF-dot OD	rtPCR OG	MF-dot OG	rtPCR Lait	Mfdot LAIT	Traitement tarissement	N° Lot	Réforme ou mort	rtPCR Lait
11004	1	SAINE		+	Pas de croissance			-			4		
11005	3	SAINE		+	Pas de croissance			+	Mcc	spéciorlac + tylan	4		+
11006	1	SAINE		+	Pas de croissance			-	Pas de croissance		4		-
11007	1	SAINE						-			4		
11009	3->1	Primipare malade	1 traitement Tylan 10j	+				+			4		+
11010	3	Primipare malade : grumeaux +++ bilatéral	1 traitement Tylan 10j	+		+	Pas de croissance	+	Mcc	spéciorlac + tylan	2		+
11011											4		-
11012	3	Primipare "guérie"	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	+				+	Mcc			R 20/07	
11017	1	Primipare avec rechutes	2 traitements au Tylan (2X pdt 10j)	-		-	Pas de croissance	+	Mcc	spéciorlac + tylan	4		+
11019	1	SAINE						-			4		
11020	1	SAINE						+			3		+
11021	1	Primipare "guérie"	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	+				+		spéciorlac + tylan		M 14/09	
11022	3	Primipare "guérie"	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	+		+	Pas de croissance	+	Mcc	spéciorlac + tylan	4		-
11024	1	SAINE						-			2		
11025	1	SAINE		+	Pas de croissance			-			4		
11026	1	SAINE						-			4		
11027											3		-
11028	1	Arthrites ? 12/04/12		-	Pas de croissance			+			3		+
11029	1	Primipare avec rechutes	2 traitements au Tylan (2X pdt 10j)	-		-	Pas de croissance	-	Pas de croissance	nafpenzal	4		-
11032	1	SAINE		+	Mcc			-	Pas de croissance		3		
11033	1	SAINE						-			4		
11035	1	SAINE						-			4		
11038	3	Primipare "guérie"	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	+		-	Pas de croissance	+	Mcc		2		-
11039	1	SAINE						-			4		
11040	1	SAINE						-			3		+
11041	3	Primipare avec rechutes	2 traitements au Tylan (2X pdt 10j)	+				+	Mcc	spéciorlac + tylan		M 15/10	

		Prélèvements le 18/05/12								Prélèvements le 29/11/12			
N° de travail	N° Lot	Anamnèse	Traitement	rtPCR OD	MF-dot OD	rtPCR OG	MF-dot OG	rtPCR Lait	Mfdot LAIT	Traitement tarissement	N° Lot	Réforme ou mort	rtPCR Lait
11045	3	Primipare "guérie" après traitement puis rechute -> résolu sans traitement	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	-				+	Mcc	spéciorlac + tylan	5		-
11046	3	Saine		+				+	Pas de croissance	spéciorlac + tylan	4		-
11048	3	Primipare "guérie"	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	+		+	Pas de croissance	-	Mcc		4		-
11050	1	SAINE						-			4		
11051	1	SAINE						-			5?		-
11053	1	SAINE						-			4		
11055	3	Primipare "guérie"	1 traitement au Tylan 10j + Lyncomycine IntraMammaire	+				+	Mcc	spéciorlac + tylan	4		+
11058	3	Primipare malade	1 traitement Tylan 10j	+				+	Mcc	spéciorlac + tylan	2		+
11059	1	SAINE						-			4		+
11061	1	SAINE						+		spéciorlac + tylan	2		-
11063	1	SAINE						-			4		
11064	1	SAINE		+	Mcc			+	Pas de croissance	spéciorlac + tylan	2		+
11067	1	SAINE		-	Pas de croissance			-			2		
11069	1	SAINE						-			3		-
11071	1	Primipare avec rechutes	2 traitements au Tylan (2X pdt 10j)	-		+	Pas de croissance	+	Mcc	spéciorlac + tylan	2		+
11076	1	SAINE						-			4		
11080	1	SAINE		+	Mmc			-			4		-
11081	1	SAINE						-			4		
11085	1	Arthrites ? 12/04/12		+	GC : Mmc PC : Mcc			-				M 20/08	
11089	1	SAINE						-			4		
11105	3	SAINE											
11109	3	SAINE										R 20/07	
11118	3	saine		-				-	Pas de croissance		3		+
11130	1	SAINE						+			4		-
11143	1	SAINE						-				R 20/07	
11147	1	SAINE		+	GC : Mmc PC : Mmc			-			3		-
60605	3	SAINE						-				R 20/07	
66508	3	SAINE						+			2		-
66518	3	SAINE						-				R 20/07	
66525											3		-
66526											4		-
66535	3	SAINE										R 20/07	
66570											3		-
77609	1	SAINE						-			4		

		Prélèvements le 18/05/12								Prélèvements le 29/11/12			
N° de travail	N° Lot	Anamnèse	Traitement	rtPCR OD	MF-dot OD	rtPCR OG	MF-dot OG	rtPCR Lait	Mfdot LAIT	Traitement tarissement	N° Lot	Réforme ou mort	rtPCR Lait
77610	1	SAINE		+	GC : Mmc PC : Mmc			-		nafpenzal	4		
77612	3	SAINE										R 04/07	
77632	3	SAINE		+	Mmc			-	Pas de croissance			R 20/07	
77641	1	SAINE						-			4		
80909	3	SAINE										R 20/07	
88709	1	SAINE										R 20/07	
88721	3	SAINE						-				R 20/07	
88727	1	SAINE						+			4		-
88732	1	SAINE						-		nafpenzal	2		
88742	1	SAINE						+			4		-
88751	3	SAINE						-			3		
88752	3	SAINE						-				R 20/07	
88767	3	SAINE						-				R 20/07	
99805	3	SAINE						-					
99817	1	SAINE		+	Pas de croissance			-			2		
99818	3	SAINE						-				R 20/07	
99826	3	SAINE		+	Pas de croissance			-	Pas de croissance			R 20/07	
99831	3	SAINE		+	Mmc			-				R 20/07	
99847	1	SAINE						-			2		
99849	3	SAINE		+	Pas de croissance			-				R 20/07	
99850	1	SAINE						-			3		
99854	3	SAINE		+	Pas de croissance			-			3		-

Annexe 11 : Protocole de typage par VNTR

Concentration du mix :

Mix (pour un échantillon)	1x
H ₂ O	17.7 µl
dNTP mix	0.5µl
TR_Mcc1F (40µM)	0.25 µl
TR_Mcc1R (40µM)	0.25 µl
Go-Taq	0.3 µl
Tp 5x (avec MgCl ₂)	5 µl
Volume réactionnel total	24 µl

Aliquoter les 24 µl + 1µl d'ADN

Programme thermocycleur TR1 :

94°C 2 min

30 cycles (94°C 30sec/ 55° C 30sec / 72°C 1min)

72°C 5min puis 10°C à l'infini

Témoins : positif (15751) et négatif (H₂O)

Migration sur gel :

Gel Agarose 2.5%

Dépôts 3µl dans chaque puits

Migration 3h à 70V

Taille attendue : TR5 843 bp modulo 42

BONNET SANDRINE

Méthodes alternatives rapides pour l'identification des mycoplasmes : une voie d'amélioration de VIGIMYC, réseau d'épidémiosurveillance des mycoplasmoses en France.

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 1^{er} juillet 2014

RESUME :

Le principal objectif de ces travaux était d'évaluer la place et l'intérêt des techniques de PCR pour le diagnostic et le suivi clinique des mycoplasmoses chez les ruminants. Cette évaluation a été faite, d'une part, via une enquête auprès des laboratoires vétérinaires de France qu'ils soient membres ou non du réseau d'épidémiosurveillance VIGIMYC et d'autre part, via le suivi clinique par rtPCR d'un foyer caprin d'agalactie contagieuse.

Pour la première partie, il apparaît que les techniques de PCR sont encore très peu utilisées par les laboratoires pour le diagnostic des mycoplasmoses chez les petits ruminants ; la mise en culture suivie de l'identification par MF-dot telle que déployée dans le réseau VIGIMYC reste la méthode de référence. Ceci suggère que les données issues de l'épidémiosurveillance effectuée par VIGIMYC sont assez représentatives de la situation réelle pour les petits ruminants. En revanche, en filière bovine, les techniques de PCR commencent à se démocratiser au sein des laboratoires vétérinaires français.

Lors du suivi de l'élevage caprin atteint d'agalactie contagieuse, nous avons démontré qu'il serait pertinent de coupler les deux méthodes : la rtPCR, permettant de connaître rapidement le statut sanitaire de l'élevage, et la culture et le MF-dot, permettant de conserver et d'identifier la souche mycoplasmique en cause et d'étudier la clonalité de la souche circulante par sous-typage.

MOTS CLES :

- Diagnostic
- Mycoplasmes
- Ruminants
- Biologie moléculaire

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur VANHEMS
1er Assesseur :	Madame le Docteur BECKER
2ème Assesseur :	Monsieur le Docteur BRUYERE
Membre invité :	Madame TARDY

DATE DE SOUTENANCE : 1^{er} juillet 2014

ADRESSE DE L'AUTEUR :

**435 Allée du château
69360 SIMANDRES**